Aus der Kinderklinik C der Universität zu Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. med. H. J. Bremer)

DER STOFFWECHSEL DES LYSINS BEIM MENSCHEN - ANGEBORENE STOFFWECHSELSTÖRUNGEN

von

Hildegard Przyrembel

Als Habilitationsschrift vorgelegt der
Hohen Medizinischen Fakultät zu Düsseldorf

Düsseldorf 1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544328_0012

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus der Kinderklinik C der Universität zu Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. med. H. J. Bremer)

DER STOFFWECHSEL DES LYSINS BEIM MENSCHEN - ANGEBORENE STOFFWECHSELSTÖRUNGEN

von

Hildegard Przyrembel

Als Habilitationsschrift vorgelegt der
Hohen Medizinischen Fakultät zu Düsseldorf

Düsseldorf 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG
2.	EINLEITUNG
2.1.	STOFFWECHSELVERHALTEN DES LYSINS
2.2.	ABBAU DES LYSINS
2.2.1.	Der Pipecolinsäureabbauweg
2.2.2.	Der Saccharopinabbauweg
2.2.2.1.	Die Lysinsynthese über Saccharopin
2.2.2.2.	Der Lysinabbau über Saccharopin
2.2.2.2.1.	Saccharopin
2.2.2.2.2.	2-Aminoadipinsäure
2.2.2.2.3.	2-Oxoadipinsäure
2.2.2.2.4.	2-Oxoadipinsäureabbau
2.2.2.2.5.	Glutaryl-CoA-Abbau
2.2.2.3.	Andere Lysinabbauwege
2.2.2.4.	Lysin im Harnstoffzyklus
2.3.	ABBAU DES HYDROXYLYSINS
2.3.1.	Hydroxylysinabbau bei Säugetieren und Bakterien
2.3.2.	Hydroxylysinabbau in Bakterien
2.4.	ABBAU DES TRYPTOPHANBENZOLRINGES
3.	HEREDITÄRE STOFFWECHSELSTÖRUNGEN IM ABBAU VON LYSIN, HYDROXYLYSIN UND DES BENZOLRINGES DES TRYPTOPHAN
3.1.	Hyperlysinämie mit bekanntem Enzymdefekt
3.1.1.	Hyperlysinämie mit unbekanntem Enzymdefekt
3.2.	Saccharopinurie
3.3.	Alphaaminoadipaturie
3.4.	Alphaketoadipaturie
3.5.	Glutarazidurie
3.6.	Lysinintoleranz mit periodischer Ammoniakintoxikation
3.7.	Hyperpipecolatämie

3.8. Hydroxylysinurie oder Hydroxylysinämie

4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1. Methodik
4.1.1. Gewinnung von Untersuchungsmaterial
4.1.2. Dünnschichtchromatografie der Urinaminosäuren
4.1.3. Dünnschichtchromatografie der Dinitrophenylhydrazinderivate von 2-Oxosäuren des Urins
4.1.4. Säulenchromatografie der Aminosäuren
4.1.5. Darstellung und Identifizierung von 2-Aminoadipinsäure
4.1.6. Darstellung von Pipecolinsäure
4.1.6.1. Vorversuche mit authentischer Pipecolinsäure
4.1.6.2. Pipecolinsäure im Patientenserum
4.1.6.3. Kolorimetrische Messung der Pipecolinsäure
4.1.7. Gaschromatografie organischer Säuren
4.1.7.1. Nichtflüchtige organische Säuren
4.1.7.2. Flüchtige organische Säuren
4.1.7.3. Gaschromatografie - Massenspektrometrie
4.1.8. Degradationsversuche in kultivierten Fibroblasten

4.2. PATIENTEN

4.2.1. ALPHAKETOADIPATURIE

4.2.1.1. Familienanamnese
4.2.1.2. Krankengeschichte
4.2.1.3. Allgemeine Untersuchungsbefunde
4.2.1.4. Spezielle biochemische Untersuchungen
4.2.1.4.1. Darstellung und Identifizierung von 2-Aminoadipinsäure
4.2.1.4.2. Darstellung und Identifizierung von 2-Oxoadipinsäure
4.2.1.4.3. Aminosäuren in Plasma, Liquor cerebrospinalis und Urin
4.2.1.4.4. Identifizierung und Bestimmung anderer organischer Säuren
4.2.1.4.5. Belastungstests mit L-Lysin
4.2.1.4.6. Belastungstest mit allo-5-Hydroxy-D,L-lysin
4.2.1.4.7. Belastungstest mit L-Tryptophan
4.2.1.4.8. Belastungstest mit D,L-Pipecolinsäure
4.2.1.4.9. Degradationsuntersuchungen in Fibroblasten
4.2.1.5. Untersuchungen an Familienangehörigen

4.2.1.6. DISKUSSION
4.2.1.6.1. Der Enzymdefekt der Alphaketoadipaturie
4.2.1.6.2. Sekundäre Folgen des Enzymdefektes
4.2.1.6.3. Schlußfolgerungen aus den Belastungstests

4.2.2. GLUTARAZIDURIE TYP II
4.2.2.1. Familienanamnese
4.2.2.2. Krankengeschichte
4.2.2.3. Sektionsbefund
4.2.2.4. Allgemeine Untersuchungsbefunde
4.2.2.5. Spezielle biochemische Untersuchungen
4.2.2.5.1. Aminosäuren
4.2.2.5.2. Organische Säuren
4.2.2.5.3. Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten
4.2.2.6. Untersuchungen an Familienangehörigen
4.2.2.7. DISKUSSION
4.2.2.7.1. Abgrenzung gegen das Krankheitsbild der Isovalerianazidämie
4.2.2.7.2. Abgrenzung gegen das Krankheitsbild der Dikarboxylazidurie
4.2.2.7.3. Abgrenzung gegen das Krankheitsbild der Glutarazidurie mit Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defekt
4.2.2.7.4. Abgrenzung gegen das durch Hypoglycin hervorgerufene Krankheitsbild
4.2.2.7.5. Abgrenzung gegenüber dem Reye-Syndrom
4.2.2.7.6. Stoffwechseldefekte der Glutarazidurie II

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen von gezielten Screeninguntersuchungen wurden neue Störungen des Lysinstoffwechsels entdeckt, die α-Ketoadipaturie und die Glutarazidurie Typ II.

Das Kind mit der α-Ketoadipaturie wurde mit einer Ichthyosis congenita geboren und hatte einen Krampfanfall am ersten Lebenstag. Die geistige und motorische Entwicklung dieser jetzt vier Jahre alten Patientin ist verzögert, ohne daß ein Zusammenhang mit der Stoffwechselstörung beweisbar ist - wie auch bei weiteren seither beschriebenen Fällen mit denselben metabolischen Veränderungen. Diese bestehen in einer Vermehrung von 2-Aminoadipat im Blut und im Urin, sowie in einer Ausscheidung von 2-Oxoadipat, 2-Hydroxyadipat und Glutarat im Urin. Bei letzterem ist allerdings eine Entstehung durch spontane oder bakterielle Dekarboxylierung von 2-Oxoadipat im Urin anzunehmen. Die Ausscheidung dieser Metaboliten ist von der Lysinzufuhr in der Nahrung abhängig und steigt an nach Gabe von Lysin, Tryptophan und Pipecolinsäure. In intakten Fibroblastenkulturen aus einer Hautbiopsie ist die $^{14}CO_2$-Freisetzung aus 1-^{14}C-markierter 2-Aminoadipinsäure und 2-Oxoadipinsäure vermindert, die aus [1,5-^{14}C]-markierter Glutarsäure jedoch normal, ebenso die Aktivität der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase in Fibroblastenhomogenaten. Ursächlich handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Defekt der 2-Oxoadipat-Dehydrogenase. Dieses Enzym katalysiert die Dekarboxylierung von 2-Oxoadipat zu Glutarat, einem gemeinsamen Abbauschritt im Stoffwechsel des Lysins, Hydroxylysins und des Tryptophan-Benzolringes. Der Defekt dieser Patientin liefert den indirekten Beweis, daß dieser Abbauweg auch für den menschlichen Organismus gilt. 2-Hydroxyadipinsäure entsteht durch Reduktion der sich anstauenden 2-Oxoadipinsäure. Die verminderte 2-Oxoadipat-Dekarboxylierung ist durch Zufuhr von Thiamin als Bestandteil des Enzymkomplexes nicht zu korrigieren. Eine vermehrte 2-Oxoglutaratausscheidung war nicht nachzuweisen, was als Hinweis auf die Existenz einer spezifischen 2-Oxoadipat-Dehydrogenase gewertet werden kann. Pipecolinsäure, die in einem, für den Menschen bisher nicht bewie-

senen, Nebenabbauweg des Lysins entstehen kann, war im Serum der Patientin auch nach Lysinzufuhr nicht nachweisbar. Die Gabe von Pipecolinsäure führte jedoch zu einer vermehrten Ausscheidung von 2-Aminoadipinsäure, 2-Oxoadipinsäure, 2-Hydroxyadipinsäure und Glutarsäure im Urin. Dieses dient als indirekter Beweis für die Fähigkeit des Menschen, Pipecolinsäure über Δ_1-Piperidein-6-carbonsäure zu 2-Aminoadipat zu verstoffwechseln.

Der Patient mit dem Glutarazidurie Typ II genannten Krankheitsbild verstarb am dritten Lebenstag mit Hypoglykämie und metabolischer Acidose und war auffällig durch einen schweißartigen Geruch des Körpers, des Blutes und des Urins. Der auffälligste chemische Befund bestand in einer Vermehrung von Glutarat im Serum und Urin. Daneben fanden sich erhöhte Konzentrationen von Lysin und Valin im Blut bei allgemeiner Hyperaminoacidurie und Ausscheidung von Pipecolinsäure im Urin. Auffällig waren daneben im Serum das Vorhandensein von Äthylmalonsäure und die Vermehrung von mittelkettigen Dicarbonsäuren und langkettigen Fettsäuren sowie im Urin die Vermehrung von flüchtigen unverzweigten und verzweigten kurzkettigen Fettsäuren, von gesättigten und ungesättigten mittelkettigen Dicarbonsäuren und das Auftreten von Äthylmalonsäure. Fibroblastenkulturen aus einer Hautbiopsie setzten vermindert $^{14}CO_2$ frei aus [U-^{14}C]-markierten verzweigtkettigen Aminosäuren, 2-Oxoisovaleriansäure und 2-Oxoisocapronsäure sowie aus [1,5-^{14}C]-Glutarsäure, während markierte Brentraubensäure normal verstoffwechselt werden konnte. Die Aktivität der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase in Fibroblastenhomogenaten dagegen war normal, wie auch die Synthese von Flavinadenindinucleotid und Flavinmononucleotid in Fibroblasten. Damit unterscheidet sich dieser Patient nicht nur klinisch sondern auch biochemisch von den fünf bisher beschriebenen Patienten mit verminderter Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität. Im Unterschied zur Isovalerianazidämie mit defekter Dehydrogenierung von Isovalerat im Abbau des Leucins ist der Stoffwechsel von Valin und Isoleucin ebenfalls betroffen. Das wiederum schließt einen Vergleich mit beschriebenen Fällen von Dicarboxylazidurien

als Folge gestörter ß-Oxidation von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren aus. Große Ähnlichkeit besteht jedoch mit den durch Hypoglycin-Vergiftung bei Mensch und Tier hervorgerufenen Veränderungen. Hypoglycin führt im Tierexperiment zu einer Störung von verschiedenen Acyl-CoA-Dehydrogenasen und die sich anstauenden Acyl-Coenzym A-Ester sekundär zu Hemmungen der Glukoneogenese. Bei dem beschriebenen Patienten muß eine ähnlich komplexe Störung postuliert werden.

In einer Übersicht werden die experimentellen Daten über den Lysinabbau in Bakterien, Tieren und Menschen zusammengefaßt. Der sich daraus ergebende Hauptabbauweg des Lysins über Saccharopin ⟶ 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd ⟶ 2-Aminoadipinsäure ⟶ 2-Oxoadipinsäure ⟶ Glutaryl-CoA sowie die Abbauwege mit für den Menschen geringerer Bedeutung werden dargestellt. Die Abbauschritte des Hydroxylysins und Tryptophanbenzolringes werden erwähnt bis zu ihrem Zusammentreffen mit denen des Lysinabbaus (Abbildung 1).

Defekte im Lysinabbau auf allen Stufen des Hauptweges bis zu 2-Oxoadipinsäure waren zuvor für den Menschen beschrieben worden und werden, ebenso wie postulierte Defekte von Nebenabbauwegen des Lysins sowie des Hydroxylysinabbaus, in einer Literaturübersicht zusammengestellt. Eine Störung der beiden folgenden Schritte, der 2-Oxoadipat-Dekarboxylierung und der Glutaryl-CoA-Dehydrogenierung wurde bei den beiden eigenen Patienten nachgewiesen.

Die Messung und Identifizierung der Metaboliten erfolgte für die Aminosäuren durch Ionenaustauschchromatografie, für die organischen Säuren durch Gaschromatografie-Massenspektrometrie und für die Pipecolinsäure durch kolorimetrische Bestimmung.

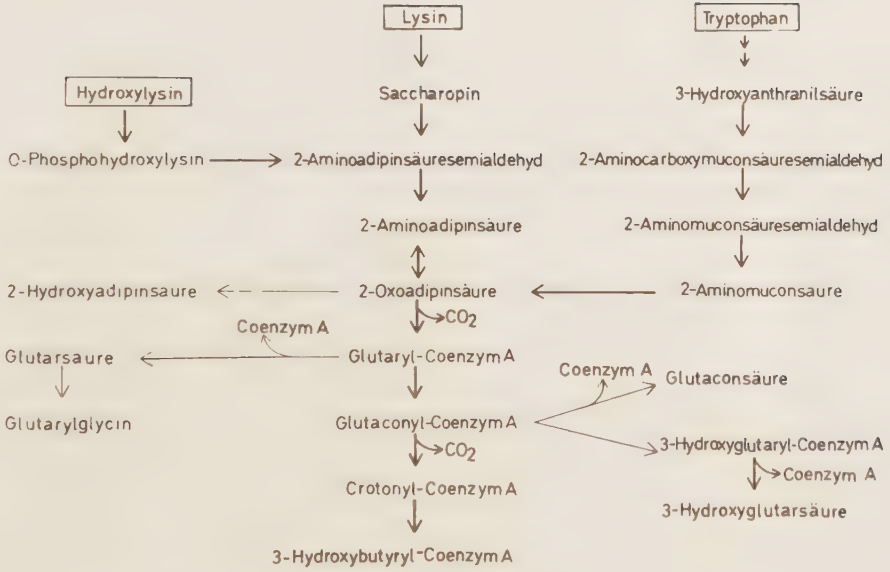


Abbildung 1 : Gemeinsame Abbauschritte im Stoffwechsel von Lysin, Hydroxylysin und dem Benzolring des Tryptophans.

2. EINLEITUNG

Unser heutiges Wissen über den normalen Lysinstoffwechsel des Menschen ist noch nicht sehr alt und in einigen Bereichen auch noch unvollständig. Übertragung von Ergebnissen, die in Tierexperimenten gewonnen wurden, auf den Menschen ist aufgrund von speziesspezifischen Unterschieden nur eingeschränkt möglich. Organspezifische Differenzen in den Hauptabbauwegen erschweren zusätzlich das Verständnis.

Wichtige Hinweise über den "normalen" Stoffwechsel konnten für den Menschen mit der Aufdeckung von Stoffwechselblocks im Lysinabbau und deren Auswirkung auf das Metabolitenspektrum in Körperflüssigkeiten gewonnen werden. Dabei hat in einzelnen Fällen die Beobachtung der chemischen Folgen eines Stoffwechselblocks hinsichtlich des Metabolitenspektrums aussagekräftigere Hinweise über den normalen Lysinabbau ergeben, als die Bestimmung von "Enzymaktivitäten" in Organen in vitro.

In den Jahren zwischen 1964 und 1975 ist auf diese Weise für praktisch jeden Schritt in der nunmehr als hauptsächlich betrachteten Abbausequenz Lysin ⟶ Saccharopin ⟶ (2-Aminoadipinsäuresemialdehyd) ⟶ 2-Aminoadipinsäure ⟶ 2-Oxoadipinsäure ⟶ Glutaryl-CoA ⟶ (Glutaconyl-CoA) ⟶ Crotonyl-CoA ein entsprechender Enzymdefekt an Patienten gefunden worden, womit die Bedeutung des jeweiligen Abbauschrittes für den Menschen erhärtet werden konnte. Zufällig entsprach die zeitliche Aufeinanderfolge der Aufdeckung dieser Defekte auch noch ihrer Folge im Lysinabbau.

Daß daneben auch Stoffwechselstörungen gefunden wurden, deren angenommene Enzymdefekte sich nicht in dieses Schema einpassen lassen, hat die Diskussion über mögliche Nebenabbauwege des Lysins weiterhin in Gang gehalten.

Diese Arbeit gibt einen Überblick über die gegenwärtigen Kenntnisse des Lysinabbaus bei Mensch und Tier, eine Zusammenfassung der chemischen und klinischen Veränderungen, die durch hereditäre

Stoffwechseldefekte induziert werden, sowie eigene Untersuchungen über zwei von unserer Arbeitsgruppe entdeckte Lysinabbaudefekte, die Alphaketoadipaturie und die Glutarazidurie Typ II.

2.1. STOFFWECHSELVERHALTEN DES LYSINS

Aus Studien an Mäusen, denen Deuterium-haltiges Wasser gefüttert worden war und deren Körper auf den Deuteriumgehalt in ihren Aminosäuren untersucht wurden, zogen Foster u. Mitarb. (1938) den Schluß, daß Lysin im Organismus nicht teilnimmt

a) an Desaminierungsreaktionen zu den entsprechenden Oxosäuren und
b) an enzymatischen Reaktionen, die an C-Atome gebundenen Wasserstoff verändern.

Weissman und Schoenheimer (1941) verfütterten Deuterium-haltiges [2-^{15}N-] Lysin an Ratten und fanden

a) 20 - 25 % des ^{15}N in Urin und Faezes, den Rest vorwiegend im Körperprotein,
b) ^{15}N in Cystin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Arginin, die aus Organhydrolysaten isoliert wurden,
c) dieselbe Relation von ^{15}N zu Deuterium im Lysin des Körperproteins wie im verfütterten Lysin.

Sie betrachteten das als Beweis, daß Lysin nicht an reversiblen Transaminierungsreaktionen im Körper teilnimmt, bzw. daß seine Desaminierung irreversibel ist. Damit unterscheidet sich diese essentielle Aminosäure von den meisten anderen essentiellen Aminosäuren. Eine essentielle Aminosäure ist definiert nach Rose (1938) als "one which cannot be synthesized by the animal organism..... at a speed commensurate with the demands for normal growth".

In dieser Definition ist gleichzeitig eine Abhängigkeit des Lysinbedarfs von der Wachstumsgeschwindigkeit des Organismus impliziert. So wurde der minimale Lysinbedarf des erwachsenen Menschen

mit 0,8 g/Tag von Rose u. Mitarb. (1955) sehr niedrig gefunden. Bei Säuglingen wurde die täglich notwendige Lysinzufuhr, um Gewichtszunahme, positive Stickstoffbilanz und normale Serumeiweißwerte zu erhalten, mit 90 - 105 mg Lysin/kg/Tag bestimmt (Snyderman u. Mitarb., 1959). D-Lysin kann dabei L-Lysin nicht ersetzen (Rose, 1938 - Rose u. Mitarb., 1955).

In Versuchen an Ratten konnten Neuberger und Sanger (1944) zeigen, daß N^{ε}-Methyllysin Lysin ersetzen kann.

2.2. ABBAU DES LYSINS

Die möglichen Abbauwege des Lysins sind in Abbildung 2 dargestellt. Neuberger und Sanger (1944) hatten nachweisen können, daß D- bzw. L-Lysin nicht von D- bzw. L-Aminosäurenoxidasen angegriffen werden, wohl aber N^{ε}-azetyliertes D- oder L-Lysin. Später fanden allerdings Wang und Nesheim (1972) L-Aminosäurenoxidaseaktivität gegenüber Lysin in der mikrosomalen Fraktion von Kükenleberhomogenat.

Die Frage ob als erster Abbauschritt ein Verlust der Aminogruppe an C_2 oder C_6 erfolge, konnte damit nicht entschieden werden.

2.2.1. Der Pipecolinsäureabbauweg

Für die erstgenannte Möglichkeit sprachen Untersuchungen von Rothstein u. Miller (1953, 1954 a. u. b) an Ratten, von Schweet u. Mitarb. (1954) mit Neurospora und von Boulanger u. Mitarb. (1957) an Putenleber. Dabei würde 2-Oxo-6-aminocapronsäure entstehen, die spontan zu Δ_1-Piperidein-2-carbonsäure zyklisieren könnte. Möglicherweise geht der Desaminierung an C_2 eine Azetylierung an N^{ε} voraus. Ein entsprechendes azetylierendes Enzym wurde von Paik und Kim (1964) aus Rinderleber dargestellt. Nach Desaminierung von N^{ε}-Acetyllysin zu 2-Oxo-6-acetamidocapronsäure entsteht mit Hilfe einer N^{ε}-Lysin-Azylase 2-Oxo-6-aminocapronsäure bzw. Δ_1-Piperidein-2-carbonsäure. In der Schweineniere wurde ein derartiges Enzym nachgewiesen (Paik u. Benoiton, 1963).

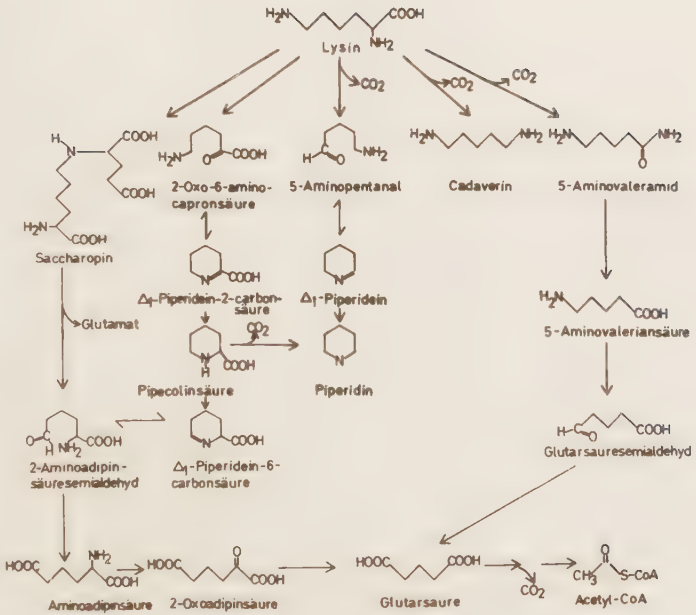


Abbildung 2 : Abbauwege des Lysins. Von gesicherter Bedeutung für den Menschen ist bisher nur der Abbau über Saccharopin, von fraglicher Bedeutung der Abbau über Pipecolinsäure.

Das entsprechende Abbauschema sieht dann folgendermaßen aus:

Lysin ⟶ (6-N-Acetyllysin ⟶ 2-Oxo-6-acetamidocapronsäure) ⟶ 2-Oxo-6-aminocapronsäure ⟷ Δ_1-Piperidein-2-carbonsäure.

Δ_1-Piperidein-2-carbonsäure wird zu L-Pipecolinsäure (Piperidin-2-carbonsäure) reduziert (Schweet u. Mitarb., 1954 - Boulanger u. Mitarb., 1969) mit Hilfe einer Δ_1-Piperidein-2-carbonsäurereduktase (Meister u. Mitarb., 1957).

Markierte Pipecolinsäure fand sich im Urin von Ratten, die [6-^{14}C]-L-Lysin oder $^{15}N^{\varepsilon}$-Lysin intraperitoneal injiziert bekommen hatten - nicht aber nach Gabe von $^{15}N^{\alpha}$-Lysin - (Rothstein und Miller, 1953, 1954 a u. b), in Bohnen nach Injektion von [6-^{14}C]-L-Lysin (Grobbelaar und Steward, 1953) und in Neurospora nach Inkubation mit [1-^{14}C]-Lysin (Schweet u. Mitarb., 1954). Dieser Abbauweg zur Pipecolinsäure ist nachgewiesen in Ratten (Grove u. Mitarb., 1969 - Boulanger u. Mitarb., 1969), im Gehirn von Ratten (Chang, 1976 - Chang, 1978 a u. b), in Mäusen (Schmidt-Glenewinkel u. Mitarb., 1977), in Hühnern (Grove und Roghair, 1971 - Wang und Nesheim, 1972), in verschiedenen Bakterien (Chang und Adams, 1971), sowie aufgrund von Untersuchungen von Ghadimi u. Mitarb. (1971) an Homogenaten von menschlicher und Hundeleber.

Einzelne Spezies bilden L-Pipecolinsäure vorwiegend oder ausschließlich aus D-Lysin: Ratten (Grove und Henderson, 1968 - Grove u. Mitarb., 1969), manche Pflanzen (Leistner u. Mitarb., 1973) und Pseudomonas putida (Chang und Adams, 1971). Über Pipecolinsäure kann Neurospora crassa D- in L-Lysin umwandeln (Müller und Leistner, 1975).

Pipecolinsäure wird von Achromobacter (Lindstedt u. Mitarb., 1967), Pseudomonas putida (Hartline und Rodwell, 1971 - Chang und Adams, 1971 u. 1977 - Perfetti u. Mitarb., 1972), in geringem Maße von Ratten (Rothstein und Greenberg, 1960), in Rattenleber und -niere, Kaninchenleber und -niere und Meerschweinchenniere

(Lindstedt u. Mitarb., 1967), kaum jedoch in menschlicher oder Hundeleber (Ghadimi u. Mitarb., 1971) weiter abgebaut zur Δ_1-Piperidein-6-carbonsäure, die im Gleichgewicht steht mit dem 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd.

Hühner können D- und L-Lysin gleich gut verstoffwechseln, wobei D-Lysin über die Pipecolinsäure, L-Lysin über die Pipecolinsäure oder das Saccharopin abgebaut werden kann (Grove und Roghair, 1971 - Wang und Nesheim, 1972), möglicherweise geregelt durch die Verfügbarkeit von reduziertem NADP. Pipecolinsäure wird dann rasch über 2-Aminoadipinsäure und 2-Oxoadipinsäure weiter abgebaut (Grove und Roghair, 1971).

Der Hauptabbauweg des Lysins im Rattengehirn führt nach Untersuchungen von Chang (1976, 1978 a u. b) über L-Pipecolinsäure. Nach intraventrikulärer Gabe von D- oder L-^{14}C-Lysin findet sich die höchste spezifische Aktivität in der Pipecolinsäure des Gehirns; nach 24 Stunden wird auch markierte Pipecolinsäure im Urin und in der Leber gefunden; nur Spuren von ^{14}C-Aminoadipinsäure wurden nachgewiesen. Nach intraperitonealer Gabe findet sich dagegen ^{14}C-Pipecolinsäure vorwiegend im Urin, weniger im Gehirn. Durch gleichzeitige Gabe nichtmarkierter Pipecolinsäure sinkt der Anteil markierter Pipecolinsäure im Gehirn weiter ab, was vom Autor als Endprodukthemmung interpretiert wird. Nach intravenöser Gabe von [U-^{14}C]-Lysin findet sich bereits nach einer halben Minute ^{14}C-Pipecolinsäure im Gehirn. Der ^{14}C-Lysingehalt im Gehirn bleibt über 60 Minuten gleich hoch, während er im Plasma und anderen Organen absinkt. Das deutet auf eine hohe Aufnahmekapazität an der Blut-Hirnschranke für Lysin hin, wobei der Hauptabbauweg im Gehirn zur Pipecolinsäure führt, die rasch ins Blut übertritt. Der Autor sieht hier eine mögliche pathogenetische Erklärung für die biochemischen Veränderungen, die bei den beiden beschriebenen Fällen von Hyperpipecolatämie gefunden wurden: Bei gleichen Verhältnissen im menschlichen Gehirn und einem Block im Pipecolinsäureabbau im Gehirn, würde diese zunächst in vermehrter Menge im Blut erscheinen.

Kasé u. Mitarb. (1967) vermuten eine Entstehung von Piperidin durch Dekarboxylierung von Pipecolinsäure und sahen nach Inkubation von homogenisiertem Meerschweinchengehirn und -leber mit Pipecolinsäure eine Vermehrung des Piperidingehaltes. In Mäuseorganen konnten Schmidt-Glenewinkel u. Mitarb. (1977) eine derartige Anreicherung nicht nachweisen.

2.2.2. Der Saccharopinabbauweg

1965 beschrieben Higashino u. Mitarb. nach Versuchen mit Rattenleber, daß die $^{14}CO_2$-Freisetzung nach Inkubation mit [U-^{14}C]-Lysin praktisch ausschließlich in der Mitochondrienfraktion geschieht, daß dazu das Vorhandensein von 2-Oxoglutarat notwendig ist, das durch andere Metabolite des Trikarbonsäurezyklus nicht ersetzt werden kann, und daß ^{14}C-Saccharopin entsteht, wenn Lysin oder 2-Oxoglutarat ^{14}C-markiert sind.

In Umkehrung eines bekannten Lysinsyntheseweges in Hefe ergab sich daraus das folgende Abbauschema: Lysin ⟶ Saccharopin ⟶ 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd ⟶ 2-Aminoadipinsäure.

2.2.2.1. Lysinsynthese über Saccharopin

Kuo u. Mitarb. (1964) hatten die Bildung von Saccharopin (N^{ε}-(L-Glutaryl-2)-L-lysin) aus [6-^{14}C]-2-D,L-Aminoadipinsäure in Hefezellen oder Hefezellextrakten über 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd bei Vorhandensein von Glutaminsäure beschrieben. Saccharopin war zuvor von Darling und Larsen (1961) aus Bäcker- und Brauereihefe isoliert worden. Zeitlich verzögert entstand in den Versuchen von Kuo u. Mitarb. (1964) aus Saccharopin Lysin.

Die notwendigen enzymatischen Schritte der Lysinsynthese wurden später abgeklärt. Aus 2-Aminoadipinsäure entsteht in Hefezellextrakten bei Verbrauch von ATP und Oxidation von NADPH in Gegenwart von Magnesiumionen 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd (Sinha und Bhattacharjee, 1971). Über eine Aminoadipinsäuresemialdehyd-Glutamat-Reduktase (N^{ε}-(L-Glutaryl-2-)-L-lysin:NADP-Oxidoreduktase)

wird aus Aminoadipinsäuresemialdehyd und Glutamat Saccharopin gebildet. Für die Reaktion in umgekehrter Richtung kann auch NAD Koenzym sein (Jones und Broquist, 1966).

Eine vergleichbare Reaktion von [6-^{14}C]-L-Aminoadipinsäure zu ^{14}C-Saccharopin ist in Neurospora crassa beschrieben worden (Trupin und Broquist, 1965).

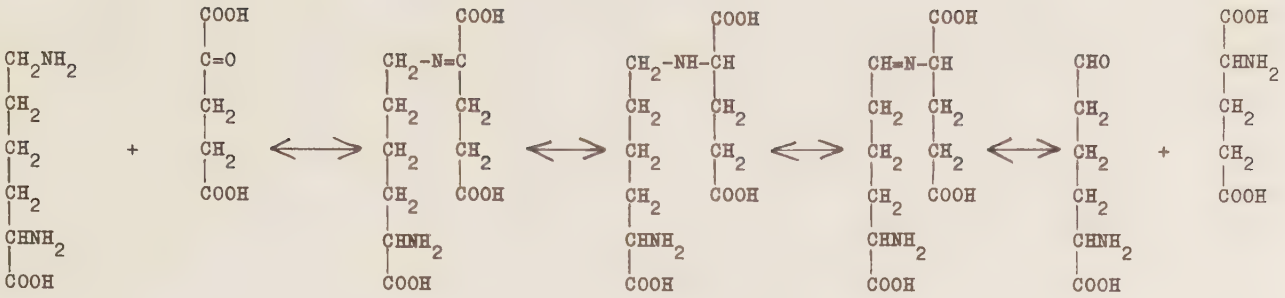
Lysin wird gebildet mit Hilfe einer Saccharopindehydrogenase (N^{ε}-(L-Glutaryl-2)-L-lysin:NAD-Oxidoreduktase), die NAD-abhängig ist, unter Freisetzung von Lysin und 2-Oxoglutarat (Saunders und Broquist, 1966). Sie wurde von Ogawa und Fujioka (1978) aus Bäckerhefe dargestellt. Diese Reaktion ist reversibel und hemmbar durch Aminosäuren von 5 - 6 C-Atomen Kettenlänge und durch ihre entsprechenden 2-Oxosäuren (Fujioka und Nakatani, 1972).

Eine entsprechende Bildung von Lysin und 2-Oxoglutarat aus Saccharopin durch eine NADP-abhängige Saccharopinoxidoreduktase, konnte in Mitochondrien aus menschlicher und Rinderleber nachgewiesen werden (Wang und Lewis, 1972). Dieses Enzym ist nicht identisch mit der Lysin-Oxoglutaratreduktase (Fellows, 1973), und zeigt eine größere Aktivität bei Säugetieren, die vorwiegend Pflanzenfresser sind und somit ein geringeres Lysinangebot mit der Nahrung haben (Fellows und Lewis, 1973). In menschlicher Plazenta dagegen konnten Fjellstedt und Robinson (1975 a) keine Saccharopinoxidoreduktase-Aktivität nachweisen.

Eine aus Rattenlebermitochondrien gereinigte Lysin-Oxoglutaratreduktase katalysierte dagegen die Lysinsynthese mit 3 - 5 % der Aktivität in Richtung Saccharopinbildung. Die Ratte besitzt möglicherweise keine spezifische Saccharopinoxidoreduktase (Noda und Ichihara, 1978).

2.2.2.2. Lysinabbau über Saccharopin

Die Kette Lysin $\longleftrightarrow$ Saccharopin $\longleftrightarrow$ 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd entspricht einer Transaminierungsreaktion über zwei Schiffsche Basen.



Lysin | 2-Oxoglutarsäure | Saccharopin | 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd | Glutaminsäure

Während in der Pipecolinsäure die Aminogruppe an C_6 von Lysin erhalten bleibt, enthält die 2-Aminoadipinsäure die Aminogruppe von C_2.

Die Bildung von Saccharopin aus Lysin und 2 -Oxoglutarat wird durch die NADP-abhängige Lysin-Oxoglutaratreduktase (L-Lysin: 2-Oxoglutarat:NADP-Oxidoreduktase) katalysiert, die von Hutzler und Dancis (1968) aus menschlichem Leberhomogenat dargestellt und gereinigt (Hutzler und Dancis, 1975) wurde. Ihre Aktivität ist am höchsten in der Leber, am niedrigsten in der Haut; dazwischen liegen Niere, Herz, Nebenniere, Schilddrüse und Gehirn. Das Enzym ist vorwiegend mitochondrial lokalisiert und unterliegt einer Endprodukthemmung (Hutzler und Dancis, 1975). Isoliert aus menschlicher Plazenta konnte es nicht von der Saccharopin-Dehydrogenase abgetrennt werden (Fjellstedt und Robinson, 1975 a), wohl aber nach Darstellung aus Rattenlebermitochondrien (Noda und Ichihara, 1978). Es reagiert in geringem Maße auch mit Hydroxylysin (Hutzler und Dancis, 1975) und ist, wie Fütterungsversuche an Ratten zeigten, substratinduzierbar (Hussein und Müller, 1978). Anaerobe Versuchsbedingungen fördern die Bildung von Saccharopin bei der Ratte (Grove und Henderson, 1968) und bei Küken (Wang und Nesheim, 1972), während Ghadimi u. Mitarb. (1971) in menschlicher und Hundeleber keine Unterschiede bei aeroben bzw. anaeroben Verhältnissen sahen. Die höchste Aktivität des Enzyms findet sich in Lebermitochondrien von Schwein und Schaf, in absteigender Reihenfolge dann bei Ratte, Ochse, Katze, Mensch und Hund (Fellows und Lewis, 1973).

2.2.2.2.1. Saccharopin

^{14}C-Saccharopin wird von Rattenlebermitochondrien-Homogenaten in ^{14}C-Aminoadipinsäure umgewandelt, wozu NAD nötig ist (Grove und Henderson, 1968). Saccharopin passiert offenbar nicht die intakte Mitochondrienmembran (Higashino u. Mitarb., 1967). Das zugehörige Enzym Saccharopindehydrogenase (6-N-(L-Glutaryl-2)-L-lysin:NAD-Oxidoreduktase) wurde aus menschlicher Leber (Hutzler und Dancis, 1970) und Plazenta (Fjellstedt und Robinson, 1975 b) dargestellt. Außer dort wurde Aktivität nur in Nierengewebe nachgewiesen (Hutzler und Dancis, 1975). Die Saccharopindehydrogenase hat eine um 37 % höhere spezifische Aktivität als die Lysin-Oxoglutaratreduktase. Das Enzym hat die höchste Aktivität im Lebergewebe der Katze, dann folgen Schwein, Schaf, Hund, Ratte, Mensch, Rind (Fellows und Lewis, 1973). Die Saccharopindehydrogenase ist vorwiegend mitochondrial lokalisiert, außer bei der Maus, wo sich die gleiche Aktivität mitochondrial wie zytoplasmatisch nachweisen läßt (Higashino u. Mitarb., 1971). Bei dieser Reaktion wird 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd gebildet. Eine L-2-Aminoadipinsäure-5-semialdehyd:NAD-Oxidoreduktase ist in Bakterien beschrieben worden (Calvert und Rodwell, 1966), die zur Bildung von L-2-Aminoadipinsäure führt.

Die Bildung von 2-Aminoadipinsäure in mit [6-^{14}C]-L-Lysin inkubiertem Homogenat aus Meerschweinchenleber wurde 1948 von Borsook u. Mitarb. (1948 a und b) beschrieben, ebenso wie die Bildung von [6-^{14}C]-2-Oxoadipinsäure und [1,5-^{14}C]-Glutarsäure nach Inkubation mit [6-^{14}C]-Aminoadipinsäure (Borsook u. Mitarb., 1948 c). Dabei wurde von den Autoren die Vermutung ausgesprochen, daß die Bildung von 2-Aminoadipinsäure und die Dekarboxylierung von 2-Oxoadipinsäure schneller ablaufe als die Transaminierung der 2-Aminoadipinsäure. Die Aminogruppe der auf diesem Wege entstandenen 2-Aminoadipinsäure entspricht der Aminogruppe an C_2 des Lysins, im Gegensatz dazu bleibt in der über

den Pipecolinsäureweg des Lysins gebildeten 2-Aminoadipinsäure die Aminogruppe von C_6 erhalten (Grove und Roghair, 1971).

.2.2.2.2. 2-Aminoadipinsäure

2-Aminoadipinsäure wird in Gegenwart von 2-Oxoglutarsäure in Rattenleber (Nakatani u. Mitarb., 1970 - Boulanger und Mizon, 1976) durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige spezifische 2-Aminoadipinsäure-Aminotransferase rasch transaminiert. Das Enzym wurde von Tobes und Mason (1975 und 1977) aus Rattenleber und -niere dargestellt und ist mit der Kynurenin-Aminotransferase (Tobes und Mason, 1975 und 1977) und möglicherweise mit einer Tyrosin-Aminotransferase identisch (Tobes und Mason, 1978). 2-Aminoadipat und Kynurenin hemmen sich bei der Reaktion gegenseitig, d.h. bei vermehrtem Lysinangebot würde möglicherweise weniger Kynurenin- und Xanthurensäure gebildet werden. Das wiederum könnte zu vermehrter 2-Oxoadipinsäurebildung aus 3-Hydroxyanthranilsäure führen.

.2.2.2.3. 2-Oxoadipinsäure

2-Oxoadipinsäure entsteht sowohl aus Lysin (Borsook u. Mitarb., 1948 c - Grove und Roghair, 1971), als auch aus Tryptophan (siehe Tryptophanabbau) (Gholson u. Mitarb., 1962). Sie wird zu Glutaryl-CoA dekarboxyliert, durch einen vorwiegend mitochondrial lokalisierten Enzymkomplex, dessen Identität mit der 2-Oxoglutaratdehydrogenase nicht bewiesen ist. Immerhin wies ein aus Schweineherz gereinigter 2-Oxoglutaratdehydrogenase-Komplex eine gewisse Aktivität gegenüber der 2-Oxoadipinsäure auf (Hirashima u. Mitarb., 1967 - Kanzaki u. Mitarb., 1969).

.2.2.2.4. 2-Oxoadipinsäureabbau

Die 2-Oxoadipinsäuredehydrogenase-Aktivität ist bei der Ratte am höchsten im Herzmuskel und in der Niere, also in Geweben, die reich

an Mitochondrien sind (Suda u. Mitarb., 1977). Sie nimmt bei der Ratte von der Fetalzeit zur Postnatalzeit zu (Suda u.Mitarb.,1978). Der Enzymkomplex benötigt wie andere 2-Oxosäuren-Dehydrogenase-Komplexe Coenzym A, NAD, Thiaminpyrophosphat, und enthält Liponsäure und FAD. Bei Fehlen von Coenzym A, NAD oder Thiaminpyrophosphat kommt es in Rinder- und Rattenleberhomogenat sowie in menschlichem Leukozytenhomogenat nach Inkubation mit [1-^{14}C]-Aminoadipinsäure zum Anstau von [1-^{14}C]-Oxoadipinsäure (Wilson u.Mitarb., 1976).

Eine alternative Möglichkeit des 2-Oxoadipinsäureabbaus besteht in der Reduktion zur 2-Hydroxyadipinsäure durch ein spezifisches, zytoplasmatisches, NADH-abhängiges Enzym, die 2-Oxoadipinsäure-Reduktase, das aus menschlicher Plazenta gereinigt wurde (Suda u. Mitarb.,1976). Bei der Ratte ist die Aktivität dieses Enzyms wiederum am höchsten in der Herzmuskulatur. Typischerweise ist aber die Relation der Aktivitäten von Dehydrogenase/Reduktase am höchsten in "aeroben" Geweben wie Niere und Herzmuskulatur und niedrig in mitochondrienarmen Geweben wie der Skelettmuskulatur. Die Relation nimmt in allen Geweben, allerdings in unterschiedlichem Ausmaße, von der Prae- zur Postnatalperiode zu (Suda u. Mitarb., 1978).

Die Bildung von [1,5-^{14}C]-Glutarat nach Inkubation von Meerschweinchenleberhomogenat mit [6-^{14}C]-Aminoadipat war schon früh bekannt (Borsook u. Mitarb., 1948 c). Ratten scheiden nach intraperitonealer Gabe von [6-^{14}C]-L-Lysin oder [6-^{14}C]-2-Aminoadipinsäure markiertes Glutarat im Urin aus (Rothstein und Miller, 1956), Küken nach Gabe von ^{14}C-Lysin (Grove und Roghair, 1971) und Ratten auch nach Gabe von [7α-^{14}C]-D,L-Tryptophan (Gholson u. Mitarb., 1959). [1,5-^{14}C]-Glutarat wird von Rattenlebermitochondrien rasch abgebaut (Rothstein und Greenberg, 1960). Aus dem Markierungsmuster von Urinmetaboliten bzw. Organmetaboliten von Ratten nach Injektion von [1,5-^{14}C]-Glutarat bzw. [3-^{14}C]-Glutarat kamen verschiedene Autoren zu verschiedenen Abbauwegen für Glutarat: Glutarat ⟶ Glutaconat ⟶ 2-Hydroxyglutarat ⟶ 2-Oxoglutarat (Rothstein u. Miller, 1954 c) bzw. Glutarat ⟶ Glutaconat ⟶ 3-Hydroxyglutarat ⟶ Acetondicarbonsäure (Hobbs und Koeppe, 1958). Aus Pseudomonas fluorescens wurde ein Enzym isoliert, das Glutaryl-CoA unter Dehydrogenierung zum Glutaconyl-CoA dekarboxy-

liert, das FAD enthält und substratspezifisch ist (Numa u. Mitarb., 1964). Aus dem Markierungsmuster von aus Organen von Ratten und Hunden isolierten Aminosäuren nach Fütterung von [6-^{14}C]-Lysin und [2-^{14}C]-Lysin schlossen Meghal u. Mitarb. (1966) auf Glutaryl-CoA als Intermediärprodukt im Lysin- bzw. Tryptophanabbau. Sie schlossen freies Glutarat als Intermediärprodukt aus.

2.2.2.2.5. Glutaryl-CoA-Abbau

Besrat u. Mitarb. (1969) reinigten aus Rinderleber und -niere eine Glutaryl-CoA-Dehydrogenase, die sowohl die Bildung von Glutaconyl-CoA als von Crotonyl-CoA katalysierte. Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität, gemessen an der $^{14}CO_2$-Produktion nach Inkubation mit [1,5-^{14}C]-Glutaryl-CoA war in menschlichen Lebermitochondrien und Leukozyten bzw. Fibroblasten nachweisbar (Goodman und Kohlhoff, 1975 - Goodman u. Mitarb., 1977).

2.2.2.3. Andere Lysinabbauwege

Andere Abbauwege des Lysins, deren Vorkommen im Säugetierorganismus, insbesondere im Menschen, jedoch nicht geklärt sind, sind die folgenden:

1. Dekarboxylierung von Lysin zu Cadaverin durch die Lysindekarboxylase (Gale, 1946) ist vor allem für Pflanzen und Bakterien von Bedeutung. Cadaverinbildung aus Lysin im Mäusegehirn wurde von Schmidt-Glenewinkel u. Mitarb. (1977) gefunden.

2. Bildung von Piperidin aus Lysin über 5-Aminopentanal (Leistner und Spenser, 1973) und über Pipecolinsäure (Kasé u. Mitarb., 1967).

3. Umwandlung von Lysin in 5-Aminovaleramid durch die Lysin-Monooxygenase, weiter in 5-Aminovalerat durch die 5-Aminovaleramidase und in Glutarsäuresemialdehyd und Glutarat durch eine Glutamat-5-Aminovalerat-Aminotransferase bzw. Glutarsäuresemialdehyddehydrogenase (Chang und Adams, 1971 - Chang und Adams, 1977 b).

4. Abbau von Lysin zu Butyrat und Acetat (Onodera und Kandatsu, 1975 - Stadtman, 1963).

5. Bildung von 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd durch eine L-Lysin-2-Oxoglutarat-6-Aminotransferase (Misono und Soda, 1977).

2.2.2.4. Lysin im Harnstoffzyklus

Darüberhinaus ist bei Säugetieren eine Aktivität von einzelnen Harnstoffzyklusenzymen gegenüber Lysin statt Ornithin beschrieben: Ratten, die [U-^{14}C]-D,L-Lysin injiziert bekamen, schieden ^{14}C-Homocitrullin und ^{14}C-Homoarginin aus, ebenso war bei erwachsenen Menschen nach Aufnahme von 4 g Lysin-HCl eine Ausscheidung von Homocitrullin und Homoarginin zu beobachten (Ryan und Wells, 1964). Ornithincarbamoyltransferase aus Rinderleber hatte für Lysin einen 10-fach höheren K_M-Wert als für Ornithin, während der K_M-Wert der Arginase für Homoarginin 200-fach höher war als der für Arginin. Eine Bildung von [^{14}C]-Lysin aus L-Homo[U-^{14}C-lysin]-citrullin durch Rattenleber- oder -nierenhomogenate wurde nicht beobachtet (Paik u. Mitarb., 1977).

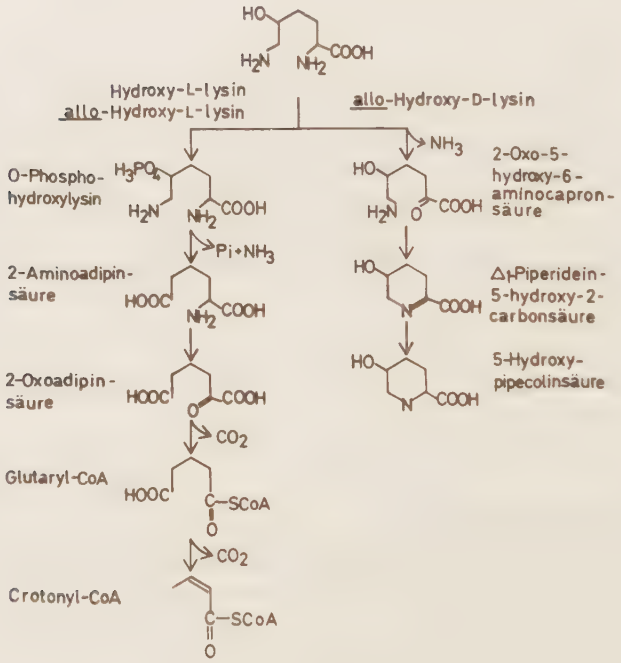
2.3. ABBAU DES HYDROXYLYSINS

5-Hydroxylysin, das beim Abbau von Kollagen frei wird, geht nicht in die Eiweißsynthese ein, sondern wird verstoffwechselt (Sinex u. Mitarb., 1959).

2.3.1. Hydroxylysinabbau bei Tieren und Bakterien

Nachdem ursprünglich nach Versuchen mit Homogenaten von Rattenleber und -niere und mit Bakterien ein dem Pipecolinsäureweg des Lysinabbaus paralleler Weg über 2-Oxo-5-hydroxy-6-aminocapronsäure ⟶ Δ_1-Piperidein-5-hydroxy-2-carbonsäure ⟶ 5-Hydroxypipecolinsäure ⟶ Δ_1-Piperidein-3-hydroxy-6-carbonsäure ⟶ 2-Amino-5-hydroxyadipinsäuresemialdehyd ⟶ 2-Amino-5-hydroxyadipinsäure ⟶ 2-Oxo-5-hydroxyadipinsäure ⟶ 2-Hydroxyglutarsäure angenommen worden war (Lindstedt und Lindstedt, 1959 - Lindstedt u. Mitarb., 1967

Abbildung 3 : Abbauwege des Hydroxylysins bei Tieren (und Bakterien)



- Lindahl u. Mitarb., 1967), konnte dieses später nur für allo-Hydroxy-D-lysin bei der Ratte, beim Huhn und in verschiedenen Bakterien bestätigt werden (Hammerstedt u. Mitarb., 1968 - Hiles u. Mitarb., 1972 - Friede u. Henderson, 1976). Hydroxy-D-lysin wird praktisch nicht verstoffwechselt (Hammerstedt u. Mitarb., 1968 - Hiles u. Mitarb., 1972).

Ein anderer Abbauweg im Säugetierorganismus erschien wahrscheinlich, nachdem Ratten, die ^{14}C-markiertes Hydroxy-D,L-lysin, allo-Hydroxy-D,L-lysin und tritium-markiertes Hydroxy-L-lysin intraperitoneal erhalten hatten, im Urin markierte 2-Oxoadipinsäure, Glutarsäure und Crotonsäure ausschieden (Polan u. Mitarb., 1967).

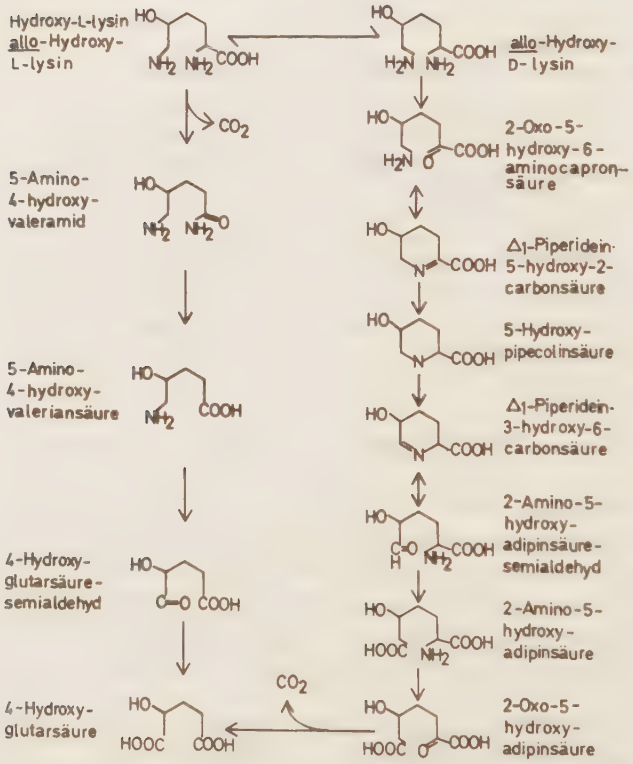
Hiles u. Mitarb. (1972) fanden, daß Rattenleberextrakt nach Inkubation mit Hydroxy[6-^{14}C]-L-lysin in Gegenwart von ATP oder GTP O-Phosphohydroxylysin enthielt und bei Vorhandensein von Pyridoxalphosphat und NAD 2-Aminoadipinsäure (bzw. 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd) bildete.

Auf dieser Stufe treffen der Lysin- und Hydroxylysinabbau zusammen.

Eine GTP-abhängige Hydroxylysinkinase (Guanosintriphosphat:5-Hydroxy-L-Lysin O-Phosphotransferase) wurde von Hiles und Henderson (1972) aus Rattenleber gereinigt, die Aktivität gegenüber allo-Hydroxy-L-lysin und Hydroxy-L-lysin aufwies, nicht jedoch gegenüber den D-Formen. Eine Aktivität dieses Enzyms konnte auch in Leber und Niere von Küken, Mäusen, Rindern, Kaninchen und Affen nachgewiesen werden.

Das Enzym, das den nächsten Abbauschritt katalysiert, eine O-Phosphohydroxylsin-Phospholyase, die spezifisch ist und Pyridoxalphosphat braucht, wurde ebenfalls aus Rattenleber gereinigt (Tsai und Henderson, 1974 a), sowie das Enzym, das den dabei entstehenden L- oder allo-L-2-Aminoadipinsäuresemialdehyd zu 2-Aminoadipinsäure oxidiert, eine spezifische, NAD-abhängige 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, die wie alle bisherigen Enzyme im Zytoplasma lokalisiert ist (Tsai und Henderson, 1974 b) und daher für den mitochondrialen Lysinabbau keine Rolle spielen dürfte.

Abbildung 4 : Hydroxylysinabbau in Bakterien



Die im Tierorganismus ablaufenden Reaktionen sind in der Abbildung 3 dargestellt.

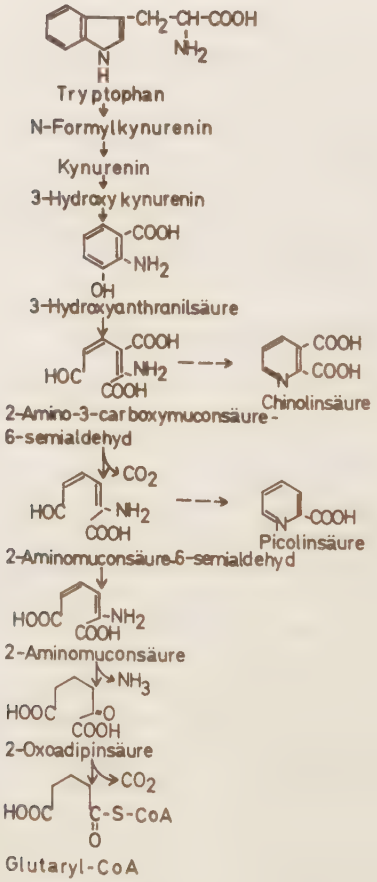
2.3.2. Hydroxylysinabbau in Bakterien

Für Bakterien wurde darüberhinaus ein Abbauweg von Hydroxy-L-lysin bzw. allo-Hydroxy-L-lysin nachgewiesen, der in seinen Reaktionsschritten dem Valeramidabbau des Lysins entspricht, aber durch spezifische Enzyme katalysiert wird: über 5-Amino-4-hydroxyvaleramid ⟶ 5-Amino-4-hydroxyvalerat ⟶ 4-Hydroxyglutarsäuresemialdehyd zu 4-Hydroxyglutarat (Friede und Henderson, 1976). Die bakteriellen Abbauwege sind in Abbildung 4 dargestellt.

2.4. ABBAU DES TRYPTOPHAN-BENZOLRINGES

Nach intraperitonealer Gabe von [7α-^{14}C]-D,L-Tryptophan an Ratten erschienen 36 % der gegebenen Dosis innerhalb von 12 Stunden als $^{14}CO_2$ in der Ausatmungsluft, 40 - 50 % wurden in Aminosäuren, vor allem der Leber, wiedergefunden (Gholson u. Mitarb., 1958). 3-Hydroxyanthranilsäure, die als Intermediärprodukt beim Abbau des Benzolringes des Tryptophan entsteht (Gholson u. Mitarb., 1959), wird von der Ratte zu Glutarsäure verstoffwechselt (Gholson u. Mitarb., 1960). In Katzen- oder Rattenleberhomogenat ensteht nach Inkubation mit im Benzolring ^{14}C-markierter 3-Hydroxyanthranilsäure ^{14}C-markiertes 2-Oxoadipat, Acetat und Glutarat, wenn Coenzym A und NAD vorhanden sind. [^{3}H]-3-Hydroxyanthranilsäure wird dabei zu 2-Amino-3-carboxymuconsäure-6-semialdehyd und schließlich Glutarsäure abgebaut (Nishizuka u. Mitarb., 1965). Der 2-Amino-3-carboxymuconsäure-6-semialdehyd zyklisiert spontan zu Chinolinsäure (Henderson u. Hirsch, 1949). Für die Bildung von Glutarat aus 3-Hydroxyanthranilsäure sind fünf enzymatische Schritte notwendig, die durch die folgenden Enzyme katalysiert werden: Die 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxygenase bildet 2-Amino-3-carboxymuconsäure-6-semialdehyd, die Picolinsäurecarboxylase bildet 2-Aminomuconsäure-6-semialdehyd, der spontan zu Picolinsäure zyklisieren kann (Mehler, 1956), die

Abbildung 5 : Abbau des Tryptophanbenzolringes



2-Aminomuconsäure-6-semialdehyd-Dehydrogenase bildet 2-Aminomuconsäure, die 2-Aminomuconsäurereduktase bildet 2-Oxoadipinsäure, und eine 2-Oxoadipinsäure- (oder 2-Oxoglutarat-)Dehydrogenase bildet Glutarat (Nishizuka u. Mitarb., 1970). Diese Schritte sind in der Abbildung 5 dargestellt.

3. HEREDITÄRE STOFFWECHSELSTÖRUNGEN IM ABBAU VON LYSIN, HYDROXYLYSIN UND DES BENZOLRINGES DES TRYPTOPHANS

3.1. Hyperlysinämie mit bekanntem Enzymdefekt (Persistierende Hyperlysinämie)

Dieser Stoffwechseldefekt im Lysinabbau wurde zuerst von Woody (1964) beschrieben. Bis heute sind fünf Patienten mit gesichertem Block der Lysin-2-Oxoglutarat-Reduktase mitgeteilt worden (Dancis u. Mitarb., 1976 - van Gelderen und Teijema, 1973). Bei einem sechsten und siebten Patienten ist derselbe Enzymdefekt wahrscheinlich, da diese mit den obengenannten Patienten verwandt sind (Woody u. Mitarb., 1966 - van Gelderen und Teijema, 1973).

Bei drei weiteren Patienten mit Hyperlysinämie liegt dagegen möglicherweise ein anderer Enzymdefekt vor (Ghadimi u. Mitarb., 1965 - Armstrong und Robinow, 1967).

Woody beschrieb 1964 ein viereinhalbjähriges Mädchen aus einer Verwandtenehe mit den folgenden Symptomen: Geistige Retardierung, Minderwuchs, häufige Krampfanfälle, Anämie und Muskelschwäche. Das letztgenannte Symptom normalisierte sich im Laufe der Entwicklung. Im Urin wurde, papierchromatografisch bestimmt, konstant vermehrt Lysin (13,2 mMol/24 Std.), Ornithin (0,48 mMol/24 Std.), Arginin (0,18 mMol/24 Std.) und gelegentlich Cystin gefunden. Außerdem waren Pipecolinsäure und 2-Aminoadipinsäure sowie 2-Oxoglutarsäure vermehrt. 2-Oxoadipinsäure war dagegen normal. Im Plasma war Lysin konstant erhöht (1,354 uMol/ml) und 2-Aminoadipinsäure gelegentlich nachweisbar (bis 0,0497 uMol/ml). Ebenso war der Lysinspiegel im Liquor cerebrospinalis erhöht.

Bei der Untersuchung von Familienmitgliedern wurde eine neunjährige, normal entwickelte und normal intelligente Kusine mit Hyperlysinurie gefunden. Eine Bestimmung ihres Plasmalysinspiegels im Alter von elf Jahren ergab eine Konzentration von 0,930 uMol/ml.

Später wurden zwei jüngere Geschwister der Probandin, ein Junge und ein Mädchen, mit Hyperlysinämie und Hyperlysinurie entdeckt. Bei dem Jungen war im Säuglingsalter Lysin in Plasma und Urin normal gewesen (Smith u. Mitarb., 1971). Beide Geschwister hatten ophthalmologische Auffälligkeiten: Der Junge wies eine Parese des rechten M. rectus lateralis und eine beidseitige Linsensubluxation auf, seine Schwester eine beidseitige Sphärophakie, die sich spontan fast normalisierte (Smith u. Mitarb., 1971). Der Junge wird überdies als "geistig langsam" beschrieben (Dancis u.Mitarb.,1976).

Eine orale Lysinbelastung (300 mg/kg) bei der Indexpatientin ergab, ausgehend von einem stark erhöhten Lysinspiegel (papierchromatografisch semiquantitativ bestimmt und daher hier nicht zitiert), einen als "normal" interpretierten Kurvenverlauf über drei Stunden. Sie führte zu einer vermehrten Lysinausscheidung im Urin bei normaler Lysinclearance. Eine lysinfreie Ernährung über drei Tage und eine lysinarme Diät (90 mg Lysin/kg/24 Std.) über einen Monat führten zu keinem Abfall der Lysinspiegel im Plasma oder im Urin.

Die intramuskuläre Gabe von jeweils 25 mC [U-^{14}C]-Lysin an die Indexpatientin und an ihre Schwester sowie an zwei Kontrollkinder führte bei den Patienten zu einem geringeren $^{14}CO_2$-Gehalt der Ausatmungsluft (0,6 und 0,4 % der gegebenen Dosis) und zu einer größeren Ausscheidung von ^{14}C-markierten Metaboliten im Urin (16 und 3,3 % der Dosis) als bei den Kontrollen (7,4 und 9,1 % als $^{14}CO_2$ bzw. 2,8 und 3,5 % im Urin). Durch vorherige orale Belastung mit Lysin (150 mg/kg) 45 Minuten vor der Injektion von ^{14}C-Lysin, konnte bei den Kontrollen das Verhältnis des $^{14}CO_2$-Gehaltes der Ausatmungsluft zu dem ^{14}C-Gehalt in den Metaboliten im Urin noch vergrößert werden (Woody u. Mitarb., 1966).

Die Patienten schieden im Urin konstant N^{ε}-Acetyllysin (590 bzw. 580 uMol/g Kreatinin), Homocitrullin (570 bzw. 720 uMol/g Kreatinin), Homoarginin (630 bzw. 1410 uMol/g Kreatinin), Pipecolinsäure

(24 - 48 uMol/g Kreatinin - Woody und Pupene, 1970) und N^{α}-Acetyllysin aus, und diese waren nach der Gabe von ^{14}C-Lysin teilweise markiert. Dagegen fanden sich bei den Kontrollen vor der oralen Lysinbelastung weder N^{ε}-Acetyllysin, Homocitrullin noch Homoarginin im Urin, wohl aber nach der Lysingabe (Woody u.Mitarb., 1967). Patienten und Kontrollen unterschieden sich nicht in dem Prozentsatz ausgeschiedener radioaktiv markierter Lysinmetaboliten, wohl aber war der Anteil von ^{14}C in den spezifischen Metaboliten Pipecolinsäure, Homocitrullin, Homoarginin, N^{ε}-Acetyllysin und N^{α}-Acetyllysin zwei- bis siebenfach größer bei den Patienten (Woody und Pupene, 1971). Ein proximaler Abbaudefekt des Lysins wurde damit wahrscheinlich gemacht und ebenso eine vermehrte Inanspruchnahme von normalen Nebenabbauwegen.

Der vermutete Enzymdefekt wurde von Dancis u. Mitarb. (1969) durch Untersuchungen des Lysinabbaus in Fibroblastenhomogenaten von drei Geschwistern der erwähnten Familie bewiesen. Diese Fibroblasten zeigten eine Verminderung der Umwandlungsrate von Lysin in Saccharopin auf 7 - 11 % des Mittelwertes normaler Kontrollen.

Ein fünfter Patient wurde 1972 von Levy u. Mitarb. im Alter von 6 Wochen gefunden. Der Plasmalysinspiegel betrug 1,026 uMol/ml. Unter einer lysinreduzierten Diät (100 mg Lysin/kg/24 Std.) fiel der Lysinspiegel auf 0,547 bis 0,684 uMol/ml ab. Mit zweieinhalb Jahren war dieser Patient psychomotorisch normal entwickelt (Dancis, 1974).

Weiterreichende enzymatische Untersuchungen der Leber der Indexpatientin, die im Alter von dreizehn Jahren an einer Pneumonie starb, und an Mitochondrienhomogenaten aus Fibroblastenkulturen ihrer zwei Geschwister sowie des letztgenannten Patienten durch Dancis u. Mitarb. (1976), ergaben in allen Fällen Mehrfachenzymdefekte der Lysin-2-Oxoglutaratreduktase, der Saccharopindehydrogenase und der Saccharopinoxidoreduktase. Die beiden erstgenannten Enzyme wiesen in der Leber keinerlei Aktivität auf. In den Fibroblastenmitochondrien lag weniger als 10 % der Kontrollaktivität vor. Die Saccharo-

pinoxidoreduktase war in der Leber fraglich und in den Fibroblasten mit weniger als 5 % der Normalaktivität meßbar.

Da nach den Berechnungen aus den Belastungen die Indexpatientin etwa 10 % der normalen Abbaukapazität für Lysin besaß, kann eine Instabilität ihres abnormen Enzymes als Ursache für die fehlende Aktivität der Lysin-2-Oxoglutaratreduktase in der Leber nicht ausgeschlossen werden.

Regulierende Einflüsse auf die Saccharopindehydrogenase als Erklärung für ihre fehlende bzw. verminderte Aktivität bei den Patienten wurden ausgeschlossen durch Kultivierung von normalen Fibroblasten in lysinarmem bzw. -freiem Medium und durch Kultivierung von Patientenfibroblasten in Medium mit 1 mmolarer Saccharopinkonzentration. Dabei ergab sich jeweils keine Änderung in der Saccharopindehydrogenaseaktivität.

Die Aktivitäten der Glutamatdehydrogenase und der 2-Aminoadipataminotransferase waren in der Patientenleber leicht vermindert.

Eine verminderte ^{14}C-Saccharopinproduktion nach Inkubation von Fibroblasten mit ^{14}C-Lysin fanden auch van Gelderen und Teijema (1973) bei ihrem Patienten. Dieser wies außer familiärem Kleinwuchs keine klinischen Besonderheiten auf. Im Plasma war Lysin erhöht (bis 1,014 µMol/ml). Homoarginin (0,022 - 0,033 µMol/ml) und Homocitrullin (0,019 µMol/ml) waren nachweisbar, während Ornithin vermindert war (0,015 bis 0,025 µMol/ml). Saccharopin war im Plasma nicht nachweisbar, und Arginin war normal. Im Urin wurden unter normaler Kost Lysin, Cystin, Arginin und Ornithin vermehrt ausgeschieden, und die Clearances für Lysin und Cystin waren erhöht. Nach 18 Tagen lysinfreier Ernährung kam es zu einem deutlichen Abfall des Plasmalysins und von Homoarginin und Homocitrullin. Unter einer oralen Lysinbelastung (0,9 mMol/kg) stieg Lysin im Plasma auf 1,548 µMol/ml als höchsten Wert an, während Ornithin stark abfiel (auf 0,008 µMol/ml nach 7 Std.). Eine ebenfalls kleinwüchsige Schwester wies auch eine Hyperlysinämie und Hyperlysinurie auf.

3.1.1. Hyperlysinämie mit unbekanntem Enzymdefekt

Zwei miteinander nicht verwandte Patienten mit persistierender Hyperlysinämie und bisher nicht bekanntem Enzymdefekt wurden von Ghadimi u. Mitarb. (1965 a) beschrieben. Beide waren durch geistige Retardierung und muskuläre Hypotonie mit überdehnbaren Gelenken aufgefallen. Ein Patient war ein 27jähriger, schwerst geistig und körperlich retardierter Mann (I.Q. 13) mit auffällig groben Gesichtszügen, der nicht laufen konnte und auf akustische Reize nicht reagierte. Sein Elektroenzephalogramm war pathologisch. Seine Eltern waren nicht miteinander verwandt, die Mutter aber ebenfalls geistig retardiert und schwerhörig. Ihr Plasmalysinspiegel betrug 0,510/uMol/ml.

Der zweite Patient war ein zweijähriger Junge, dessen Vater gleichzeitig der Vater seiner Mutter war. Er hatte mit drei Monaten Krampfanfälle, konnte mit zwei Jahren nicht sitzen oder krabbeln und schien nicht zu hören. Das Elektroenzephalogramm war ebenfalls pathologisch.

Beide wiesen unter normaler und unter eiweißarmer Ernährung eine weniger ausgeprägte Hyperlysinämie (0,239 - 0,588/uMol/ml) auf. Im Urin fand sich vermehrt Lysin. Homoarginin war immer, Homocitrullin gelegentlich nachweisbar. Im Liquor cerebrospinalis war Lysin ebenfalls vermehrt.

Auf eine orale Lysinbelastung (150 mg L-Lysin-HCl/kg) reagierten beide mit höherem Lysinanstieg und verzögertem Abfall über 48 Std. verglichen mit Kontrollen. Der jüngere Patient schied 42 % der gegebenen Lysindosis im Urin aus. Bei beiden Patienten und bei den Kontrollen war nach Lysingabe keine Pipecolinsäure im Urin nachzuweisen.

Eine orale Belastung des älteren Patienten mit 150 mg D,L-Pipecolinsäure-HCl/kg und 150 mg L-Ornithin-HCl/kg ergab einen normalen Plasmaspiegelverlauf.

Intravenöse Gabe von 1/uC/kg ^{14}C-Lysin an den älteren Patienten und an zwei Kontrollen führte hinsichtlich der $^{14}CO_2$-Ausatmung zu vergleichbaren Werten. Neben ^{14}C-Lysin waren im Plasma des Patienten nach 25 Minuten ^{14}C-Pyruvat und ^{14}C-Acetat sowie drei unbekannte radioaktive Peaks nachweisbar. Bei den Kontrollen fanden sich dagegen ^{14}C-Pyruvat, ^{14}C-2-Oxoglutarat und ^{14}C-Acetat (Ghadimi u. Mitarb., 1967). Der Stoffwechselblock wurde bisher nicht abgeklärt.

Ein von Armstrong und Robinow (1967) beschriebener Patient mit verzögerter geistiger und motorischer Entwicklung nach einem schweren Morbus haemolyticus neonatorum und geringer, von der Nahrungszufuhr abhängiger Hyperlysinämie (0,164 - 0,351/uMol/ml) wies dagegen mit Sicherheit keinen Lysin-Oxoglutaratreduktase-Defekt in Fibroblasten auf (Dancis, 1974). Im Urin waren Lysin vermehrt (1,32 mMol/24 Std.) bei erhöhter Lysinclearance, ebenso Homoarginin (12,8/uMol/24 Std.) und Homocitrullin (22,2/uMol/24 Std.). N^{α}-Acetyllysin (31 - 78/uMol/g Kreatinin)und N^{ε}-Acetyllysin (109 /uMol/g Kreatinin) waren nachweisbar. Eine orale Lysinbelastung (150 mg/kg) ergab einen Spitzenwert von 1,040/uMol/ml Lysin im Plasma, wobei der Ausgangswert nach 24 Std. wieder erreicht war. Im Plasma waren vorübergehend 2-Aminoadipinsäure und Homoarginin zu finden. 6 % des gegebenen Lysins erschienen im Urin.

Ein Zusammenhang der klinischen Symptomatik mit den biochemischen Abnormalitäten ist in allen beschriebenen Fällen nicht zu beweisen und ist in den Fällen von nachgewiesenem Lysin-Oxoglutaratreduktasedefekt unwahrscheinlich.

3.2. Saccharopinurie

Bisher sind zwei Patienten mit dieser Stoffwechselstörung beschrieben worden, die einige Unterschiede im klinischen Bild und in den biochemischen Befunden aufweisen.

Über die erste Patientin wurde 1968 bzw. 1969 von Carson u. Mitarb. berichtet. Sie war während eines Screeningprogrammes durch einen

abnormen Fleck im zweidimensionalen Aminosäuren-Papierchromatogramm aufgefallen. Es handelte sich um eine 22-jährige kleinwüchsige Frau mit einem Intelligenzquotienten von 67 und sechs normalen Halbgeschwistern. Bis auf pathologische Enzephalografie-Kurven waren alle Untersuchungen normal. Neben erhöhten Saccharopinkonzentrationen im Plasma (0,0245 µMol/ml), Liquor cerebrospinalis (0,0251 µMol/ml) und Urin (2,272 mMol/24 Std.) waren Vermehrungen von Lysin (Plasma 0,6 - 0,75 µMol/ml, Liquor cerebrospinalis 0,222 µMol/ml, Urin 1,427 mMol/24 Std.) und Citrullin (Plasma 0,1 - 0,2 µMol/ml, Liquor cerebrospinalis 0,011 µMol/ml, Urin 1,558 mMol/24 Std.) besonders auffällig. Die Lysinplasmaspiegel entsprechen zum Teil denen bei Patienten mit Hyperlysinämie aufgrund eines Lysin-2-Oxoglutaratreduktase-Mangels. Außerdem waren im Plasma Homocitrullin und Homoarginin vermehrt, im Urin ebenfalls Homocitrullin, Homoarginin, sowie N^{ε}-Acetyllysin und 2-Aminoadipinsäure. Die Ausscheidung aller genannten Aminosäuren stieg nach oraler Belastung mit 0,1 g/kg L-Lysin im Urin deutlich an.

Die zweite Patientin, ein dreijähriges Mädchen, wurde 1972 beschrieben (Simell u. Mitarb., 1972). Ihre motorische und geistige Entwicklung war verzögert. Eine spastische Diplegie entwickelte sich, mit Schluckstörungen, geringer Dysarthrie und leichter Ataxie. Das Elektroenzephalogramm war normal bis leicht pathologisch, im Pneumenzephalogramm zeigten sich Hinweise auf eine mäßige Hirnatrophie. Saccharopin fand sich im Serum und Urin, Lysin war im Serum stark vermehrt (1,32 µMol/ml), ebenso im Urin. 2-Aminoadipinsäure war im Urin nachweisbar, hingegen keine Vermehrung von Citrullin. Alanin im Serum war mit 0,028 µMol/ml auffallend niedrig.

In beiden Fällen wurde Saccharopin durch den Vergleich mit der synthetischen Substanz in Bezug auf chromatografische Wanderungsgeschwindigkeit, färberisches Verhalten und Absorption seiner Ninhydrinderivate bei 440 nm identifiziert.

Untersuchungen an Homogenaten aus Fibroblastenkulturen und Muskelbiopsien zeigten für die zweite Patientin eine um 60 % verminderte Bildung von 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd nach Inkubation mit

Saccharopin (Simell u. Mitarb., 1973). Dagegen fehlte bei der ersten Patientin jegliche Saccharopindehydrogenase-Aktivität in Fibroblasten bzw. in Fibroblastenmitochondrien. Die Aktivität der Lysin-Oxoglutaratreduktase betrug darüberhinaus nur 37 % der bei Kontrollen gemessenen, war aber etwa zehnfach höher als bei drei Patienten mit Hyperlysinämie. Während bei Normalpersonen keine Aktivität der Saccharopinoxidoreduktase gefunden wurde, war diese meßbar in Zellen der Patientin (Fellows und Carson, 1974). Diese Tatsache wurde von den Autoren als Erklärung für die Hyperlysinämie der Patientin herangezogen.

Ein Zusammenhang zwischen dem Enzymdefekt und dem klinischen Bild der Patienten kann nicht bewiesen werden. Familienuntersuchungen erbrachten in beiden Fällen keine schlüssigen Hinweise.

Die Ursache der Citrullinvermehrung bei der ersten Patientin ist nicht bekannt. Spekulationen darüber beziehen sich auf eine Kompetition zwischen Saccharopin und Argininbernsteinsäure und einen alternativen Harnstoffzyklus mit Lysin statt Ornithin.

3.3. Alphaaminoadipaturie

Vermehrte Ausscheidung und erhöhte Plasmaspiegel von 2-Aminoadipinsäure wurden bisher bei 3 Probanden gefunden. Von diesen war der eine 6 Jahre alt, geistig retardiert und zeigte eine muskuläre Hypotonie und Dysphagie. Die Analyse der Plasmaaminosäuren war bis auf deutlich meßbare 2-Aminoadipinsäure-Spiegel (0,0381 - 0,0327 /uMol/ml) normal, die Ausscheidung von 2-Aminoadipinsäure mit 799 - 2866 /uMol/g Kreatinin erhöht. 2-Aminoadipinsäuresemialdehyd konnte im Urin nicht nachgewiesen werden. Auch der gesunde Bruder des Probanden zeigte erhöhte 2-Aminoadipinsäure-Spiegel im Blut und Urin (Lormans und Lowenthal, 1974).

In einer anderen Familie fanden sich zwei Brüder mit der gleichen biochemischen Abnormalität: 2-Aminoadipinsäure im Plasma 0,0497 /uMol/ml, im Urin 596 - 2478 /uMol/24 Std. Unter einer Belastung

mit L-Lysin oral (0,1 g/kg) stieg die Ausscheidung von 2-Aminoadipinsäure deutlich an von 770 auf 1876 und von 447 auf 652 µMol/12 Std. Die höhere Ausscheidung wurde bei einem 10 1/2 Jahre alten Jungen mit Hochwuchs, muskulärer Hypotonie, Mikrognathie, überstreckbaren Gelenken und Plattfüßen, knöchernen Defekten der Zehen, kapillären Hämangiomen und Lernstörungen gemessen. Bei seinem Bruder mit der etwas geringeren Ausscheidung fehlten die beiden letzten Symptome. 2-Oxoadipinsäure konnte in beiden Fällen im Urin nicht gefunden werden (Fischer u. Mitarb., 1974).

In beiden Beschreibungen wird ein Zusammenhang zwischen biochemischen und klinischen Befunden verneint. Enzymuntersuchungen wurden in beiden Fällen nicht durchgeführt. Ein Defekt einer spezifischen Aminotransferase wird diskutiert.

3.4. Alphaketoadipaturie

Seit der Erstbeschreibung dieser Stoffwechselstörung (Wilson u. Mitarb., 1975 - Przyrembel u. Mitarb., 1975) bei einem Geschwisterpaar und einer eigenen Patientin, sind drei weitere mögliche Fälle berichtet worden. Die Untersuchungsergebnisse unserer Patientin werden im Abschnitt 4 mitgeteilt.

Wilson u. Mitarb. (1973) berichteten über einen geistig retardierten zwölfjährigen Patienten (I.Q. 25). Er hatte nie sprechen gelernt, trotz normalen Hörvermögens. Der Patient wurde als hyperaktiv und selbstzerstörerisch beschrieben. Seine nicht blutsverwandten Eltern, seine Geschwister und Halbgeschwister sind alle normal entwickelt und scheiden bis auf eine ältere Schwester keine 2-Aminoadipinsäure aus.

Die Analyse der Plasmaaminosäuren zeigte bis auf deutlich vermehrte 2-Aminoadipinsäurespiegel beim Indexfall (0,034 µMol/ml) und seiner Schwester (0,058 µMol/ml) und einen mäßig erhöhten Phenylalaninspiegel (0,237 µMol/ml) bei dem Probanden keine Auffälligkeiten. Im Urin schied der Proband 1480 µMol/24 Std., seine Schwester 1500 µMol/24 Std. 2-Aminoadipinsäure aus. Die gleichzeitige 2-Oxoadipinsäurekonzentration im Urin betrug 62 bzw. 245 µMol/ml. Die

2-Oxoglutarsäureausscheidung war normal, und Intermediärprodukte des Tryptophanabbaus konnten nicht in vermehrter Menge nachgewiesen werden (Wilson u. Mitarb., 1975).

Über eine weitere Patientin wurde auf dem 16. Meeting der Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism im Juli 1978 von Dr. Robin Casey, Saskatoon, Kanada, berichtet: Die zwölfjährige, geistig retardierte Patientin ist adipös, hypoton und hat ein Krampfleiden. Ihre Mutter ist ebenfalls geistig retardiert, scheidet aber keine 2-Aminoadipinsäure im Urin aus.

2-Aminoadipinsäure im Plasma der Patientin war mit 0,067 µMol/ml erhöht, die Urinausscheidung betrug 510 - 1600 µMol/6 Std. bzw. 17 - 79 µMol/Std./1.73m^2. Beide Werte waren durch Thiamin und Pyridoxin in hohen Dosen nicht beeinflußbar.

Eine orale L-Lysin-Belastung (100 mg/kg) führte zu einem Anstieg von 2-Aminoadipinsäure in Plasma und Urin, ebenso eine orale L-Tryptophan-Belastung (100 mg/kg), allerdings nach einem längeren Zeitintervall als nach der Lysingabe.

2-Oxoadipinsäure konnte im Urin nicht nachgewiesen werden, dagegen scheinen 2-Hydroxyadipinsäure und Glutarsäure vermehrt ausgeschieden zu werden. Enzymatische Untersuchungen sind noch nicht durchgeführt worden.

Auf dem gleichen Kongreß wurde als vorläufige Mitteilung von J.W.T. Seakins über zwei Brüder mit 2-Aminoadipaturie und Glutarazidurie berichtet: Der Index-Patient war wegen mäßiger geistiger Retardierung untersucht worden. Er schied vermehrt 2-Aminoadipinsäure und Glutarsäure aus. Im Anschluß an eine orale Lysinbelastung (100 mg/kg) kam es neben dem Anstieg von Plasmalysin zu einem parallelen Anstieg der 2-Aminoadipinsäure. Urinproben vor und unter Belastung enthielten neben Glutarsäure (2,4 und 2,7 mMol/g Kreatinin) auch 2-Oxoadipinsäure (1,6 und 1,96 mMol/g Kreatinin) und 2-Hydroxyadipinsäure (0,45 und 0,54 mMol/g Kreatinin.

Der Bruder des Patienten scheidet die gleichen Metaboliten aus, ist aber geistig normal.

Enzymatische Untersuchungen fehlen bisher. Es könnte sich ebenfalls um einen Defekt der 2-Oxoadipinsäuredekarboxylierung handeln. Die Werte der 2-Oxoadipinsäureausscheidung sind mit denen unserer Patientin S.G. vergleichbar, die Hydroxyadipinsäureausscheidung ist geringer, die Glutarsäureausscheidung höher. Glutarsäure könnte durch spontane Dekarboxylierung aus 2-Oxoadipinsäure entstanden sein.

3.5. Glutarazidurie

Dieses Krankheitsbild, das erstmals 1974 beschrieben wurde (Goodman u. Mitarb., 1974), wird hervorgerufen durch einen Defekt im letzten Abbauschritt des Lysins, bevor sein Restkarbonskelett in die Fettsäureoxidation eingeschleust wird. Auch hierbei sind gleichzeitig der Hydroxylysinabbau und ein Abbauweg des Tryptophans mitbetroffen. Bis heute sind fünf Patienten mit diesem Defekt beschrieben worden. Weitgehend einheitliches klinisches Bild und Vererbungsgang lassen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Stoffwechselstörung und Symptomatik sehr wahrscheinlich erscheinen.

Über einen weiteren Patienten mit Glutarazidurie, aber mit sehr viel weiterreichenden biochemischen Störungen, wird gesondert als eigene Beobachtung berichtet werden.

Die beiden ersten Patienten, Bruder und Schwester, fielen nach anfänglich normaler Entwicklung, im Alter von 7 1/2 bzw. 3 Monaten durch Stillstand bzw. Rückschritte ihrer motorischen und neurologischen Entwicklung auf. Das Mädchen wies im Alter von einem Jahr eine Spastik mit tonischen Halsreflexen, Faustschluß und Überkreuzen der Beine auf. Eine Drehung aus der Rücken- in die Bauchlage und ein Kopfheben aus Rückenlage waren unmöglich. Die Patientin reagierte jedoch auf Licht und akustische Reize. Der Bruder zeigte im Alter von 7 1/2 Jahren Opisthotonus, Grimassieren, Dystonie und

Athetose. Er neigte zu Fieberattacken, verbunden mit Erbrechen und gelegentlich mit Hypoglykämie. Er starb im Alter von 10 Jahren an einer Pneumonie. Vor dem Tode entwickelte er eine schwere Hypoglykämie und metabolische Azidose. Zuvor hatte bei ihm konstant eine kompensierte metabolische Azidose bestanden (Serumbikarbonat immer $<15{,}7$ mÄq/l).

Bei der Autopsie zeigte sich eine Verfettung der inneren Organe. Es bestand ein ausgeprägtes Hirnödem mit neuronalen Veränderungen der Groß- und Kleinhirnrinde. Das Putamen zeigte eine weitgehende neuronale Degeneration mit fibröser Gliose. Ähnliche Veränderungen wurden auch im Nucleus caudatus gesehen (Goodman u. Mitarb., 1977).

Bei beiden Patienten war die Eiweißkonzentration im Liquor cerebrospinalis erhöht. Aminosäurespiegel in Plasma, Urin und Liquor cerebrospinalis waren normal. Praefinal allerdings fand sich bei dem Jungen eine generalisierte Hyperaminoazidurie, wobei auch 2-Aminoadipinsäure (4235 µMol/g Kreatinin) und Saccharopin (2236 µMol/g Kreatinin) in großer Menge im Urin erschienen.

Beide Patienten hatten stark erhöhte Glutarsäurekonzentrationen im Plasma (0,008 - 0,045 µMol/ml) und ein Patient auch im Liquor cerebrospinalis (0,0189 µMol/ml), wo sie normalerweise nicht meßbar sind. Glutarsäure war im Urin stark vermehrt (8 - 164 mMol/g Kreatinin), ebenso 3-Hydroxyglutarsäure (1,3 - 18 mMol/g Kreatinin). Glutaconsäure war intermittierend nachweisbar (Stokke u. Mitarb., 1975). Nur vor dem Tode wurde sie in größerer Menge als 3-Hydroxyglutarsäure ausgeschieden (4,3 mMol/g Kreatinin) (Goodman u. Mitarb., 1977).

Orale Belastungstests mit L-Lysin-HCl und L-Valin (jeweils 410 µMol/kg dreimal pro Tag über zwei Tage) des älteren Patienten zeigten nur nach Lysin einen starken Anstieg der Glutarsäureausscheidung (nach der Gabe von 39,4 mMol Lysin kam es zu einem Anstieg der Glutarsäureausscheidung im Urin um 50,4 mMol).

Die gleiche Lysinbelastung führte bei den Eltern nicht zu einer Glutarsäureausscheidung.

Eine diätetische Beschränkung der Proteinzufuhr von 4,1 g/kg auf 1,6 g/kg führte bei dem älteren Patienten nach vier Monaten zu einem Abfall der Glutarsäureausscheidung, jedoch zu keiner klinischen Besserung (Goodman u. Mitarb., 1975). Vor seinem Tode schied dieser Patient zusätzlich große Mengen Milchsäure, 3-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxyisovaleriansäure, Adipinsäure und Suberinsäure aus. Dieses Muster wird bei Patienten mit schwerer Ketoazidose gesehen (Pettersen u. Mitarb., 1972 - Landaas, 1974).

Zwei Brüder, deren Eltern Cousins ersten Grades sind, mit der gleichen Störung wurden von Gregersen u. Mitarb. (1977 a) beschrieben. Beide entwickelten sich verzögert in ihrer Motorik. Der Ältere fiel mit zwei Jahren durch eine zerebellare Ataxie auf. Mit sechs Jahren hatte er Artikulationsschwierigkeiten, und es begannen sich choreatiforme Bewegungsmuster zu entwickeln. Seine geistige Entwicklung mit acht Jahren erschien normal. Der jüngere Bruder hatte im Alter von 14 Monaten einen Krampfanfall und entwickelte enzephalitisähnliche Symptome. Seitdem zeigte er choreatiforme Bewegungen; er konnte nicht sitzen oder stehen. Deshalb wurde die Diagnose spastisch-hyperkinetische oder ataktische Tetraplegie gestellt. Mit vier Jahren war er aufgrund von intermittierenden dystonen Extensoren- oder Flexorenspasmen völlig hilflos. Er schien nicht schwer geistig retardiert zu sein.

Außer konstanter 2-Aminoadipinsäureausscheidung (150 - 400 µMol/24 Std.) war das Urinaminosäurenmuster normal. Analysen der Plasmaaminosäuren ergaben außer einer geringen Hyperglycinämie (0,251 - 0,562 µMol/ml) ebenfalls keine Auffälligkeit.

Bei beiden Patienten war Glutarsäure im Serum nachweisbar (0,8 und 3,8 nMol/ml).

Die Glutarsäureausscheidung schwankte von Tag zu Tag, war aber generell höher bei dem jüngeren Patienten (8,25 - 16,35 und 9,6 - 20,7 mMol/24 Std.). 3-Hydroxyglutarsäure (0,24 - 0,960 mMol/24 Std), Glutaconsäure (19,5 - 159 µMol/24 Std.) und 2-Oxoglutarsäure (100,5 - 900 µMol/24 Std.) waren regelmäßig im Urin vermehrt. 2-Oxoadipin-

säure konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Kleine Mengen von Glutarylglycin (100 - 302 uMol/g Kreatinin) wurden im Urin gefunden (Gregersen u. Mitarb., 1977 b).

Eine fünfte Patientin hatte im Alter zwischen vier und sieben Monaten Apnoeanfälle verbunden mit Hypotonie. Die motorische und geistige Entwicklung war normal bis zum Alter von einem Jahr, als es im Rahmen eines Infektes zu Krampfanfällen mit kompensierter metabolischer Azidose kam. Danach waren muskuläre Hypotonie und Dyskinesie mit Verlust von grob- und feinmotorischer Koordination auffällig. Mit zwei Jahren traten bei einem erneuten Infekt wieder Krampfanfälle, eine metabolische Azidose, und ein vorübergehender Verlust aller motorischen Fähigkeiten auf mit unwillkürlichen dystonischen Bewegungen und Haltungen. Die geistigen Fähigkeiten blieben erhalten. Eine eiweißarme Diät mit Reduktion der Lysin- (40 mg/kg) und der Tryptophanzufuhr (20 mg/kg) führte zu keiner Besserung der neurologischen Symptomatik.

Während der akuten Phasen der Krankheit bestand eine Ketonurie. Die Aminotransferaseaktivitäten im Serum waren erhöht, ebenso die Eiweißkonzentration im Liquor cerebrospinalis.

Die Aminosäurenspiegel im Plasma waren normal. Die Glutarsäureausscheidung bewegte sich zwischen 8,4 und 11,7 mMol/24 Std. unter normaler Kost und fiel unter Diät auf Werte zwischen 0,22 und 0,50 mMol/24 Std. Glutaconsäure und 3-Hydroxyglutarsäure wurden ebenfalls ausgeschieden (Kyllerman und Steen, 1977).

Der Enzymblock bei den ersten vier Patienten wurde demonstriert durch fehlende $^{14}CO_2$-Produktion aus [1,5-^{14}C]-Glutaryl-CoA in Leukozytenlysaten (Goodman u. Mitarb., 1975 - Gregersen u.Mitarb., 1977 a), während [1,5-^{14}C]-Glutarsäure von intakten Leukozyten normal verstoffwechselt wurde. Leukozytenlysate der Eltern der beiden zuerst beschriebenen Patienten zeigten Aktivitäten, die drei Standardabweichungen unterhalb des Mittelwertes derer von Normalpersonen lagen. Sie waren aber deutlich meßbar, so daß eine Identifizierung

von Heterozygoten möglich erscheint. Fehlende Aktivität wurde auch in Fibroblastenlysaten der beiden Patienten gefunden (Goodman und Kohlhoff, 1975).

In Mitochondrienhomogenaten aus der Leber des verstorbenen Patienten fehlte ebenfalls die Oxidation von Glutaryl-CoA, während die Aktivität der Glutamatdehydrogenase normal war. Darüberhinaus fand sich bei Kontrollen in Abhängigkeit von der Zeit eine Zunahme der radioaktiven Markierung in 3-Hydroxybutyrat, während diese bei dem Patienten allein im Glutarat nachweisbar blieb und 3-Hydroxybutyrat, Glutaconat und 3-Hydroxyglutarat im Reaktionsgemisch unmarkiert blieben (Goodman u. Mitarb., 1977). Damit ist ein Defekt der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase deutlich gemacht. Sowohl die Dehydrogenierung des Glutaryl-CoA zu Glutaconyl-CoA als auch dessen Dekarboxylierung zu Crotonyl-CoA scheinen betroffen zu sein.

Die im Urin erscheinende Glutarsäure entsteht durch Hydrolyse des Glutaryl-CoA. Die vermehrt ausgeschiedene Glutaconsäure könnte möglicherweise durch unspezifische Dehydrogenierung von Glutaryl-CoA oder Glutarat entstehen, z.B. durch Azyl-CoA-Dehydrogenasen. Die 3-Hydroxyglutarsäure entsteht möglicherweise durch Hydratisierung des gebildeten Glutaconyl-CoA mittels der Enoyl-CoA-Hydratase.

Als mögliche Erklärung für die klinische Symptomatik mit choreaähnlichen extrapyramidalen Bewegungsstörungen wird eine Hemmung der Glutamatdekarboxylase-I der Synaptosomen der Hirnneuronen diskutiert. Dadurch würde es zu einem Mangel an 4-Aminobuttersäure kommen. Erniedrigte Konzentrationen von 4-Aminobuttersäure in der Substantia nigra, Putamen, Globus pallidus und Nucleus caudatus von Choreapatienten (Perry u. Mitarb., 1973) und verminderte Aktivität der Glutamatdekarboxylase auf 10 - 20 % des mittleren Kontrollwertes im Nucleus caudatus, Putamen und Globus pallidus von Choreapatienten (Bird u. Mitarb., 1973) sind beschrieben worden. Stokke u. Mitarb. (1976) fanden eine kompetitive Hemmung der Glutamatdekarboxylase in Ratten- und Kaninchengehirnextrakten durch Glutarat, 3-Hydroxyglutarat und Glutaconat. Letzteres war am stärksten inhibitorisch. Der Ki-Wert für Glutarat wurde mit $1{,}3 \times 10^{-3}$ Mol/l bestimmt.

Die Glutaratkonzentration in Frontalrinde des Gehirns des verstorbenen Patienten betrug 1,04 x 10^{-3} M (Goodman u. Mitarb., 1977). Nimmt man das Vorwiegen der morphologischen Veränderungen in den Basalganglien des Gehirns dieses Patienten hinzu, ist man geneigt, diese Pathogenese als einigermaßen wahrscheinlich zu betrachten.

3.6. Lysinintoleranz mit periodischer Ammoniakintoxikation

Dieses Krankheitsbild wurde bisher ein einziges Mal beschrieben. Seine Pathogenese muß als ungeklärt gelten.

1964 berichteten Colombo u. Mitarb. über eine Patientin, die, nach unauffälliger Schwangerschaft und Geburt, bereits in den ersten Lebenswochen gehäuft erbrach. Nach Umstellung der Ernährung von Muttermilch auf Kuhmilch häuften sich die Brechattacken. Das Kind war oft apathisch und wurde erstmals mit 2 1/2 Monaten komatös. Ähnliche Episoden folgten, begleitet von Krampfanfällen und muskulärer Hypertonie. Nahrungskarenz mit parenteraler Glukose- und Elektrolytzufuhr führte jeweils zu Besserung. Das Auftreten der Bewußtseinsstörungen stand in Korrelation zur Eiweißzufuhr mit der Nahrung und war begleitet von erhöhten Blutammoniakspiegeln (159 - 218 µMol/l) sowie erhöhten Lysin- und Argininspiegeln (0,470 µMol/ml bzw. 0,356 µMol/ml) im Plasma. Unter eiweißarmer Ernährung (1,5 g/kg/24 Std.) waren die Lysin- und Argininspiegel normal und Ammoniak im Blut nur leicht erhöht.

Es fand sich kein Hinweis auf eine gestörte Leberfunktion, insbesondere fand sich kein Anhalt für einen portocavalen Shunt. Während akuter Episoden trat gelegentlich eine Erhöhung der Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Aktivität auf.

Die Serum-Harnstoffstickstoffkonzentrationen lagen im unteren Normbereich. Erhöhte Ammoniakkonzentrationen wurden auch im Liquor cerebrospinalis gefunden (97 µMol/l).

Die Urinausscheidung der Aminosäuren war auch während hyperlysinämischer Phasen normal. 2-Aminoadipinsäure wurde in normaler Menge ausgeschieden. Homocitrullin war ständig im Urin nachweisbar (10 µMol/24 Std.), während Homoarginin nie nachgewiesen werden konnte.

Kontrollierte Fütterungsversuche mit ansteigenden Mengen Eiweiß (1,5 g/kg; 3 g/kg; 6 g/kg) führten zu einem Anstieg der Plasmaspiegel von Lysin und Arginin und zu einer zunehmenden Hyperammoniämie (bis zu 350 µMol/l). Die Patientin wurde unruhig, später apathisch und komatös, gleichzeitig nahm die Rigidität der Muskulatur zu (Colombo u. Mitarb., 1967 b). Unter einer Eiweißzufuhr von 3 g/kg/24 Std. schied die Patientin kleine Mengen von Saccharopin (4,32 µMol/24 Std.)aus.

Orale Belastungstests mit L-Lysin, L-Arginin und L-Leucin (jeweils 300 mg/kg) erbrachten die folgenden Ergebnisse:
Unter einer Lysinbelastung stieg der Plasmaspiegel des Lysins von 0,301 µMol/ml auf 0,863 µMol/ml. Die Lysinclearance und die tubuläre Rückresorption blieben normal. Es kam zu keiner Pipecolinsäureausscheidung, im Gegensatz zu einem Kontrollkind unter gleicher Belastung. Die Homocitrullinausscheidung der Patientin stieg deutlich an (195,8 µMol/24 Std.), ebenso in geringerem Maße die Saccharopinausscheidung (7,2 µMol/24 Std.). Homoarginin wurde nicht gefunden. Der Kontrollpatient schied dagegen nach Belastung geringe Mengen Homoarginin und Homocitrullin, aber kein Saccharopin aus (Colombo, 1971). Ammoniak im Blut stieg von bereits erhöhten Werten auf 400 µMol/l innerhalb drei Stunden, dagegen fand sich nur ein geringer Anstieg des Serum-Harnstoffs, im Vergleich zu dem gesunden Kontrollkind. Während des fünfstündigen Tests kam es zu einer zunehmenden Hemmung der Aktivität der Erythrozytenarginase der Patientin. Dieser Effekt wurde weder bei ihren Eltern, noch bei der gesunden Kontrolle gesehen. Die Patientin wurde eine Stunde nach Aufnahme des Lysins komatös.

Belastungstests mit Leucin und Arginin führten zu keiner klinischen Symptomatik, der Anstieg des Blutammoniaks war nur gering, ebenso die Aktivitätshemmung der Arginase in Erythrozyten.

Die Arginase der Erythrozyten der Patientin zeigte eine normale Affinität für ihr Substrat und war kompetitiv durch Lysin hemmbar.

Die Aktivitäten der folgenden Enzyme wurden in Leberbiopsiehomogenat normal gefunden: Carbamoylphosphatsynthetase (gemessen an der Citrullinproduktion), Argininosuccinase (gemessen an der Harnstoffproduktion), Ornithin-Carbamoyltransferase, Glutamat-Oxalacetattransaminase, Glutamat-Pyruvattransaminase, Glutamatdehydrogenase und Glutaminase I (Colombo u. Mitarb., 1967 a). Dagegen war die Aktivität der "L-Lysindehydrogenase" (L-Lysin:NAD-Oxidoreduktase) im Leberhomogenat auf etwa 25 % des Wertes bei Normalpersonen vermindert (Bürgi u. Mitarb., 1966).

Therapeutische Versuche mit einer lysinarmen Diät (110 mg/kg/24 Std.) schienen zu klinischer Besserung zu führen, so daß die Patientin mit 14 Monaten mit dieser Diät nach Hause entlassen wurde. Im Alter von drei Jahren wurde sie wieder gesehen. Sie hatte sich psychomotorisch nicht weiter entwickelt und wies Kontrakturen der großen Gelenke auf. Teilweise dafür angeschuldigt wurde eine Mangelernährung in der Zwischenzeit. Nachdem die Nahrungszufuhr den Bedürfnissen wieder angepaßt worden war, unter Beibehaltung der Lysinreduktion, wurde die Patientin insgesamt wacher und holte in ihrer Motorik auf (Colombo u. Mitarb., 1967 b).

Pathogenetisch wurde die Aktivitätsverminderung der Lysindehydrogenase von den Autoren als ursächlich angesehen, mit daraus resultierender Hyperlysinämie, kompetitiver Hemmung der Arginase durch Lysin (dessen Affinität zu diesem Enzym höher ist als die des Arginins) und dadurch gestörter Funktion des Harnstoffzyklus mit Hyperammoniämie.

Diese Erklärung erscheint nicht stichhaltig, da sich der Enzymblock in einem Nebenabbauweg des Lysins befindet und weil beispielsweise bei Patienten mit sehr viel ausgeprägterer Hyperlysinämie aufgrund eines Lysin→2-Oxoglutaratreduktasemangels keine entsprechende Hyperammoniämie beobachtet wird.

Über "hereditary hyperlysinemia and lysine-induced crises" wurde von Ghadimi u. Mitarb. (1965 b) berichtet. Der 14-jährige Patient hatte wiederholt aufgrund einer Pankreatitis Attacken von abdominalen Schmerzen, Erbrechen, vermehrtem Speichelfluß, Muskelschwäche und Lethargie. Während dieser Attacken stiegen die Blutammoniakspiegel auf 153 µMol/l an. Über einen Zeitraum von zwei Jahren, schwankten die Plasmalysinspiegel zwischen 0,164 und 0,486 µMol/ml, die Lysinausscheidung war mit 1,97 und 7,82 mMol/24 Std. deutlich erhöht. Eine derartige Krise konnte durch einen Belastungstest mit L-Lysin (150 mg/kg) induziert werden. Sechs von vierzehn Familienmitgliedern zeigten ähnlich abnorme Reaktionen. Weitere Einzelheiten über diesen Patienten wurden seither nicht mitgeteilt.

Über einen dritten Patienten mit Hyperlysinämie und Hyperammoniämie berichteten Oyanagi u. Mitarb. (1976) und Sogawa u. Mitarb. (1977). Der Patient fiel durch Anorexie und Erbrechen seit dem zweiten Lebensmonat auf, war mit neun Jahren eindeutig dystroph und litt zunehmend unter komatösen Episoden mit Krampfanfällen. Mit 18 Jahren war er geistig retardiert (I.Q. 39), zu klein und zu leicht, mit atropher Muskulatur und Osteoporose. Unter normaler Ernährung waren Ammoniak im Blut erhöht (147 - 530 µMol/l), ebenso Lysin (0,458 µMol/ml) und Citrullin im Serum (0,179 µMol/ml). Es bestanden eine Hyperlysinurie, Hyperargininurie und ausgeprägte Homocitrullinurie. Unter eiweißbeschränkter Kost (1,0 - 1,5 g/kg) waren die Serumspiegel von Lysin und die Aminosäurenausscheidung mit Ausnahme von Homocitrullin normal, während Citrullin im Serum erhöht blieb (0,070 µMol/ml). Ein oraler Belastungstest mit L-Lysin-HCl (150 und 300 mg/kg) führte zu einem kontinuierlichen Anstieg von Lysin und Citrullin im Serum bis zu 4 Stunden nach Gabe (1,1 bzw. 0,420 µMol/ml), während Arginin geringer anstieg; ebenso war Ammoniak im Blut erhöht (200 µMol/l nach 4 Std.). Die Urinausscheidung von Lysin, Homocitrullin, Arginin und auch Ornithin nahm stark zu. Die Arginase-Aktivität in Erythrozytenhämolysat nahm unter der Lysin-Belastung ab. Ihre Aktivität unterschied sich aber nicht mehr von der bei Kontrollpersonen gemessenen, wenn die Lysinbelastung in einer Phase eiweißarmer Ernährung durchgeführt wurde. Ebenso war unter normaler Ernährung die Arginaseaktivität der Erythrozyten vermindert und vermehrt durch Lysin hemmbar. Unter eiweißarmer Er-

nährung unterschied sich ihre Hemmbarkeit durch Lysin nicht von der von Normalpersonen. Ein oraler Belastungstest mit L-Citrullin (100 mg/kg) zeigte einen normalen Verlauf der Serum-Citrullinkurve und keinen Anstieg des Lysins.

Die Aktivitäten der Ornithincarbamoyltransferase und Argininosuccinase waren in einer Leberbiopsie normal, die der Argininosuccinatsynthetase auf 22 %, der Arginase auf 29 % und der L-Lysin:NAD-Oxidoreduktase auf 64 % der jeweiligen Kontrollmittelwerte vermindert.

Pathogenetisch wurde von den Autoren spekuliert, daß der partielle Argininosuccinatsynthetasedefekt sich auf den alternativen Harnstoffzyklus ausgehend von Lysin statt Ornithin (Lysin ⟶ Homocitrullin ⟶ Homoargininbernsteinsäure ⟶ Homoarginin) (Scott-Emuakpor u. Mitarb., 1972 - Scott-Emuakpor, 1974 - Cathelineau u. Mitarb., 1974) auswirken könne, mit Anstau von Homocitrullin vor dem Block bei übermäßiger Zufuhr von Lysin. Zusammen mit der reduzierten Arginaseaktivität würde dann eine verminderte Ammoniakentgiftung resultieren. Andererseits wird eine Hemmung des Lysinabbaus u.a. durch Ammoniak und Citrullin im Rahmen anderer Harnstoffzyklusdefekte diskutiert (Levin u. Mitarb., 1973 - Levin u. Mitarb., 1974).

3.7. Hyperpipecolatämie

Diese Störung, deren Pathogenese nicht geklärt ist, wurde bisher zweimal beschrieben, und die beschriebenen Patienten ähneln sich stark im klinischen Verlauf und biochemischen Befunden.

Der erste Patient, ein Junge, hatte Ernährungsschwierigkeiten in den ersten Lebensmonaten, gedieh danach aber gut bis zum 18. Monat. Seine motorische Entwicklung war verzögert; er konnte nie frei stehen und lernte nicht sprechen. Mit sechs Monaten waren eine Hepatomegalie und muskuläre Hypotonie aufgefallen. Mit 18 Monaten zeigten sich ein horizontaler Nystagmus und Pigmentverplumpungen der

Retina mit blassen, kleinen Papillen. Es bestand ein Intentionstremor und die Eigenreflexe waren schwach auslösbar. Jegliches Interesse für die Umwelt ging im Laufe der nächsten 6 Monate verloren, in denen sich eine vollständige schlaffe Paralyse mit Trinkunfähigkeit ausbildete. Alle Laboruntersuchungen bis auf einen gering erhöhten Eiweißgehalt im Liquor cerebrospinalis und die Aminosäurenanalysen des Serums waren normal. Das Elektroenzephalogramm war pathologisch verändert. Diätetische Behandlungsversuche blieben trotz deutlich abfallender Serumpipecolinsäurespiegel ohne Erfolg, und der Patient verstarb mit 27 Monaten. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen betrafen vor allem das Gehirn, mit einer diffusen Demyelinisierung - vor allem im Pons, der Medulla oblongata und dem Kleinhirn - einer Gliose und geringeren neuronalen Degenerationszeichen. Die Leber wies eine Kapselverdickung und Fibrose auf (Gatfield u. Mitarb., 1968).

Der zweite Patient, auch ein Junge, wurde ebenfalls durch verzögerte motorische Entwicklung und Trinkschwierigkeiten auffällig. Mit sechs Monaten bestanden eine Hepatomegalie, ein Nystagmus und später wurden eine Hypotonie und eine mangelnde Gewichts- und Längenzunahme deutlich. Die Sehnenreflexe waren normal auslösbar. Die Nervenleitgeschwindigkeit und Elektromyografie waren normal, das Elektroenzephalogramm pathologisch. Das Sehvermögen war offenbar vermindert und es wurde eine zentrale Hörstörung vermutet. Der weitere Verlauf war gekennzeichnet durch häufiges hohes Fieber, zunehmende Erregbarkeit, die später in Lethargie überging. Der Umweltkontakt sowie bereits erworbene Fähigkeiten gingen verloren. Der Patient starb mit zwei Jahren an einer Pneumonie, und es wurde keine Autopsie durchgeführt (Thomas u. Mitarb., 1975).

Beide Patienten hatten stark erhöhte Serumkonzentrationen von Pipecolinsäure (0,150 - 0,395 µMol/ml - als Normalwerte sind angegeben: 0,0005 - 0,003; Gatfield u. Mitarb., 1968 und 0,008 - 0,046 µMol/ml; Thomas u. Mitarb., 1975). Im Urin waren dagegen bei beiden nur Spuren von Pipecolinsäure nachzuweisen. Liquor cerebrospinalis des einen Patienten enthielt möglicherweise etwas Pipecolinsäure. Die Pipecolinsäurekonzentration in postmortem-entnommener Leber

des Patienten von Gatfield u. Mitarb. (1968) war um das 30-fache erhöht und deutlich vermehrt im Gehirn, insbesondere dem Kleinhirn (bis zu 982 µMol/kg). Dagegen waren die Analysen aller anderen Aminosäuren in Serum, Urin, Geweben und Liquor cerebrospinalis normal. Die Homocarnosinkonzentrationen im Gehirn waren erniedrigt. Darüberhinaus fanden sich ungewöhnliche Lysindipeptide in Gehirnextrakten, die als Threonyllysin, Lysylalanin, Seryllysin, Alanyllysin und Glycyllysin identifiziert wurden (Gatfield und Taller, 1971).

Orale Belastungstests mit L-Lysin (0,2 g/kg) bzw. L-Lysin-HCl (0,15 g/kg) zeigten einen normalen Anstieg und Abfall des Lysinspiegels im Serum, ohne daß der Pipecolinsäurespiegel beeinflußt wurde. Belastungen mit 6,5 mg/kg Pipecolinsäure in Form von Bohnensaft bzw. mit 75 mg D,L-Pipecolinsäure-HCl zeigten bei beiden Patienten abnorme und verlängerte Serumspiegelerhöhungen: 1,741 µMol/ml nach einer Stunde, 0,967 µMol/ml nach 24 Std. und 1,161 µMol/ml nach 48 Std. (Thomas u. Mitarb., 1975).

Der Enzymdefekt der Hyperpipecolatämie sowie der Erbgang sind nicht bekannt.

Pipecolinsäure ist in physiologischen Flüssigkeiten normalerweise mit üblichen Methoden nicht meßbar. Eine vermehrte Ausscheidung wurde bei Frühgeborenen beschrieben (0,009 - 0,063 mMol/g Kreatinin; Woody und Pupene, 1970) und bei Patienten mit Hyperlysinämie (0,024 - 0,048 mMol/g Kreatinin; Woody und Pupene, 1970). Erhöhte Serumkonzentrationen wurden von Whitehead (1964) bei Kindern mit Kwashiorkor gefunden.

Bei vier Patienten mit zerebro-hepato-renalem Syndrom (Zellweger-Syndrom) wurden erhöhte Pipecolinsäurekonzentrationen im Serum (0,012 - 0,044 µMol/ml) und Urin (0,255 - 1,687 mMol/g Kreatinin) gemessen (Danks u. Mitarb., 1975). Dieses Syndrom unterscheidet sich sowohl klinisch (typische Fazies und Schädelform, subkortikale Nierenzysten, frühzeitige schwere neurologische Störungen mit Tod in den ersten Lebensmonaten) als auch biochemisch (Eisenspeicherung, erhöhtes Serumeisen) von den beiden beschriebenen Patien-

ten. Da das Zellweger-Syndrom jedoch auch einen protahierten Verlauf nehmen kann und spezifische Untersuchungen zum Ausschluß eines Zellweger-Syndromes bei beiden Patienten mit Hyperpipecolatämie nicht durchgeführt wurden, muß zum gegenwärtigen Zeitpunkt offenbleiben, ob es sich um eine eigenständige Krankheit handelt.

3.8. Hydroxylysinurie oder Hydroxylysinämie

Diese bisher bei sechs Patienten beschriebene Störung soll hier nur kurz erwähnt werden. Ihr liegt wahrscheinlich ein Defekt im Metabolismus des aus dem Kollagenabbau freiwerdenden Hydroxylysins zugrunde, möglicherweise einer Hydroxy-L-lysin-Kinase (Hiles und Henderson, 1972). Damit liegt der vermutete Block vor der Einmündung in den gemeinsamen Abbauweg mit Lysin auf der Stufe des 2-Aminoadipinsäuresemialdehyds.

Von vier schwer geistig retardierten Geschwistern (I.Q. zwischen 25 und 40) mit Entwicklungstillstand seit dem Alter von 12 bis 16 Monaten, Tremor, Hyperkinese, Myoklonien und großen Krampfanfällen, schieden zwei vermehrt freies Hydroxylysin im Urin aus (61 und 76 µMol/24 Std.). Bei einem Patienten war außerdem die Citrullinausscheidung vermehrt (50 µMol/24 Std.). Freies Hydroxylysin im Nüchternserum konnte nicht nachgewiesen werden, und aufgrund von oralen Hydroxylysinbelastungstests und Clearanceuntersuchungen nahmen die Autoren eine renale Ursache dieser Störung an (Benson u. Mitarb., 1969).

Eine vierjährige Patientin mit einem I.Q. von 64, geringer Sprachentwicklung, myoklonischen und großen Anfällen schied vermehrt freies Hydroxylysin (321 bis 339 µMol/g Kreatinin) und seine beiden Monoacetylderivate, vorwiegend N^{ε}-Monoacetylhydroxylysin, aus. Freies Hydroxylysin im Serum, das sich normalerweise nicht nachweisen läßt, war mit 0,008 µMol/ml erhöht. Zwei gesunde Schwestern schieden freies Hydroxylysin in leicht vermehrter Menge aus (31 und 28 µMol/g Kreatinin) (Parker u. Mitarb., 1970).

Zwei weitere, nicht miteinander verwandte Patienten, 18 und 17 Jahre alt, mit schwerer geistiger Retardierung, fehlender Sprachentwicklung und Krampfanfällen in früher Kindheit, wurden während eines Screeningprogrammes entdeckt. Wie auch die vorher geschilderten Patienten boten sie keinen Hinweis auf Knochen- oder Kollagenfehlbildungen. Die Hydroxylysinausscheidung des einen Patienten schwankte zwischen 49 und 518 /uMol/g Kreatinin, die des anderen lag konstant zwischen 50 und 63 /uMol/g Kreatinin. Eine ähnlich vermehrte Ausscheidung wurde von diesen Autoren bei einem neunjährigen Jungen mit Vitamin D-resistenter Rachitis gesehen (117 /uMol/g Kreatinin) (Hoefnagel und Pomeroy, 1970).

Die sechste Patientin mit Hydroxylysinurie war fünf Jahre alt und hatte gleichzeitig eine Trisomie 21. Unter kollagenfreier Kost schied sie zwischen 297 und 332 /uMol/24 Std. freies Hydroxylysin aus. Die Ausscheidung von gebundenem Hydroxylysin und gebundenem Hydroxyprolin war dagegen normal. Der Serumspiegel von freiem Hydroxylysin war mit 0,019 bis 0,037 /uMol/ml deutlich erhöht (Goodman und Browder, 1970). Die gefundene Substanz wurde als Hydroxy-L-lysin identifiziert, darüberhinaus fanden sich Hinweise auf das Vorhandensein der beiden Monoacetyl-Derivate. Eine orale Belastung mit Hydroxy-L-lysin (6 mg/kg für die Patientin und 5 mg/kg für eine Kontrolle mit Trisomie 21) zeigte einen höheren Anstieg des Plasma-Hydroxylysins mit verzögertem Abfall bei der Patientin. Aus der Tatsache, daß Phosphohydroxylysin im Urin nicht nachweisbar und die Ausscheidung an gebundenem Hydroxylysin normal war, kamen die Autoren zu der Hypothese, daß es sich um einen Defekt der Phosphorylierung des Hydroxylysins als erstem Schritt in seinem Abbau handeln könnte (Goodman u. Mitarb., 1972).

Zur Zeit läßt sich noch nicht sagen ob der Hydroxylysinurie ein einheitlicher genetischer Defekt mit Krankheitswert zugrundeliegt.

4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Anlaß zu den im folgenden Abschnitt geschilderten Untersuchungen waren zwei Patienten der Universitäts-Kinderklinik Düsseldorf aus den Jahren 1973 und 1974, die nach orientierenden klinisch-chemischen Untersuchungen offenbar an bisher nicht beschriebenen Störungen im Stoffwechsel des Lysins litten, wobei der Stoffwechsel des Hydroxylysins und ein Abbauweg des Tryptophans möglicherweise mitbetroffen waren.

Ein Teil der Befunde ist bereits veröffentlicht worden (Przyrembel u. Mitarb., 1975 - Wendel u. Mitarb., 1975 - Przyrembel u. Mitarb., 1976).

4.1. METHODIK

4.1.1. Gewinnung der Untersuchungsproben

a) Blut zur Bestimmung von Aminosäuren wurde durch Punktion von Kopfhaut- oder Vorderarmvenen entnommen. In der Regel waren die Patienten nüchtern, d.h. die letzte Nahrungsaufnahme lag mehr als 8 Stunden zurück. Gelegentlich konnte diese Pause nicht eingehalten werden, wenn es der klinische Zustand des Kindes nicht zuließ.

Das Blut wurde heparinisiert, sofort zentrifugiert, das Plasma innerhalb von 15 Minuten enteiweißt mit 3 % Sulfosalizylsäure (1:5), anschließend sofort zentrifugiert (10 Min., 4000 U/Min.) und der klare Überstand entweder gleich analysiert oder bei -20° eingefroren.

Serum für die Bestimmung organischer Säuren wurde nach Gerinnung des Blutes bei Zimmertemperatur durch Zentrifugieren gewonnen und bei -20° aufgehoben.

Für die Bestimmung des freien Tryptophans im Serum wurde die Enteiweißung mit 10 %iger Trichloressigsäure durchgeführt (1:5), um Verluste durch Bindung an Serumproteine zu vermeiden (McMenamy u. Mitarb., 1957), und der Überstand nach Zentrifugieren sofort analysiert.

b) Urin wurde mit den üblichen pädiatrischen Sammelsystemen aus Plastik direkt in ein eisgekühltes Sammelgefäß abgeleitet. Nach Beendigung der Sammelperiode wurden die Proben alsbald ohne Zusätze tiefgefroren.

Konzentrationsangaben in Proben aus nicht genau definierten Sammelperioden wurden auf Kreatinin bezogen.

c) Hautbiopsien für Fibroblastenkulturen wurden in der Regel ohne Lokalanästhesie durch Scherenschlag einer mit der Pinzette angehobenen Hautfalte an einer zuvor mit absolutem Äthanol und sterilem Wasser gereinigten Hautpartie entnommen.

Die Kulturbedingungen entsprachen den von Wendel u. Mitarb.(1973) angegebenen.

d) Orale Belastungen wurden mit den folgenden Aminosäuren bei einer Patientin durchgeführt: L-Lysin-HCl (Merck, Darmstadt) 0,1 g L-Lysin/kg = 0,68 mMol/kg und 0,08 g/kg = 0,55 mMol/kg (im Alter von 5,5 und 40 Monaten), L-Tryptophan (Serva, Heidelberg) 0,18 g/kg = 0,88 mMol/kg (im Alter von 40 Monaten), D,L-Pipecolinsäure-HCl (Sigma, München) 0,07 g/kg = 0,44 mMol/kg (im Alter von 41 Monaten) und allo-D,L-5-Hydroxylysin-HCl (Ferak, Berlin) 0,14 g/kg = 0,87 mMol/kg (im Alter von 41 Monaten). Die jeweilige Aminosäure wurde dabei aufgelöst in 5 % Glukoselösung oder in Apfelmus verrührt zu trinken bzw. über eine Magensonde gegeben. Vor einzelnen Belastungstests wurden 24 Std.-Urine gesammelt. Nach der Gabe wurde in 6 Std.-Portionen Urin gesammelt. Blutentnahmen geschahen jeweils vor und in einstündigen Abständen bis 6 Std. nach Gabe und gelegentlich weitere sechs Stunden später.

Bei derselben Patientin wurden die folgenden diätetischen Maßnahmen durchgeführt:

5 Tage Ernährung auf der Basis eines lysinfreien Aminosäurengemisches (speziell angefertigt unter Zugabe von Vitaminen und Mineralien von Maizena, Hamburg) 2 g/kg/Tag unter Zugabe von einer Lysinmenge, die 170 mg/kg/Tag entsprach;

5 Tage Ernährung auf der Basis desselben lysinfreien Aminosäurengemisches, ohne Zusatz von Lysin. Darunter jeweils Bestimmungen der Aminosäuren im Plasma und Urin.

4.1.2. Dünnschichtchromatografie der Urinaminosäuren

Hierbei wurde die von Kraffczyk u. Mitarb. (1971) angegebene Methode der zweidimensionalen Auftrennung mit einigen Modifikationen verwendet: Zellulose-Fertigplatten 10 x 10 cm ohne Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt).

1. Fließmittel: Pyridin/Dioxan/25 % Ammoniumhydroxid/Wasser (35/35/15/15; V/V),
2. Fließmittel: n-Butanol/Aceton/Eisessig/Wasser (35/35/10/20; V/V),

jeweils zweimal in einer Dimension. Anfärbung durch Besprühen mit Ninhydrin (0,3 %), Isatin (0,2 %) in Äthanol (70 %) und Trocknen bei 60° über 20 Minuten.

Die Urinauftragsmenge richtet sich nach der Kreatininkonzentration im Urin (Kraffczyk u. Mitarb., 1971).

Zur besseren Sichtbarmachung der Pipecolinsäure wurde vier Teilen der Färbelösung ein Teil Eisessig zugesetzt. Die Pipecolinsäure erscheint leuchtend rot-violett. Hiermit lassen sich aufgetragene Mengen bis hinunter zu 0,002 µMol sichtbar machen.

4.1.3. Dünnschichtchromatografie der Dinitrophenylhydrazinderivate von 2-Oxosäuren im Urin

Dinitrophenylhydrazone der 2-Oxosäuren wurden entsprechend der Metode von Cotte u. Mitarb. (1967) hergestellt: zu 5 ml Urin, der

gegebenenfalls vorher enteiweiß wurde, werden 5 ml destilliertes Wasser und 2 ml Dinitrophenylhydrazinlösung (0,2 g/100 ml 2 N HCl) gegeben, die Probe 12 Std. bei 4° im Dunkeln stehen gelassen. Extraktion mit Diäthyläther (25 ml). Nach Zugabe von 10 ml 10 % Na_2CO_3-Lösung und Abtrennen der wässrigen Phase wird diese mit 5 N HCl angesäuert und extrahiert mit 10, 5 und 5 ml Diäthyläther. Die Ätherphasen werden über Ammoniumsulfat getrocknet, filtriert und im Wasserbad bei 40° zur Trockne eingeengt. Der Überrest wird mit 1 ml Essigsäureäthylester wieder aufgenommen. Auftragsmenge 10 bis 20 µl punktförmig, auf Kieselgel- oder Zellulosefertigplatten (Merck, Darmstadt), zusammen mit ebenso präparierten Standardsubstanzen. Die Auftrennung geschieht eindimensional. Fließmittel: Benzol/Methanol/Eisessig (45/5/8; V/V) (Kieselgel) und n-Butanol/Äthanol/1 N NH_4OH (130/20/50; V/V) (Zellulose) (Hartline und Rodwell, 1971).

Referenzsubstanzen waren 2-Oxoglutarsäure, Brenztraubensäure, 2-Oxoadipinsäure. Bei sorgfältiger Präparation erscheint nur ein Derivat der 2-Oxoadipinsäure auf Kieselgel, zwei Derivate auf Zellulose.

4.1.4. Säulenchromatografie der Aminosäuren

a) Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren wurde mit einem automatischen Aminosäurenanalysator (Multichrom, Beckman, München) angeschlossen an einen Autolab System AA-Integrator (Spectra Physics, Darmstadt) und auf einem BC 200-Analysator (Biocal-LKB, München) nach der Zwei-Säulen-Methode von Spackman u. Mitarb. (1958) für physiologische Flüssigkeiten unter Verwendung der von Moore u. Mitarb. (1958) angegebenen Natriumcitrat-Puffer durchgeführt. Die 50 cm-Säule (ø 0,9 cm) zur Trennung saurer und neutraler Aminosäuren enthielt Beckman M 72 Spherical Ion-Exchange Resin (Beckman, München), die 30 cm-Säule (Ø 0,9 cm) zur Trennung der basischen Aminosäuren Aminex A5 (Bio Rad, München). Pufferfluß 75 ml/Std., Ninhydrinreagenz 50 ml/Std.

In diesem System erscheinen die 2-Aminoadipinsäure und 2-Aminobuttersäure als ein Peak. Eine Trennung der beiden wird erreicht

durch Erhöhung der Säulentemperatur auf 34 bis 37°. 2-Aminoadipinsäure erscheint dann zwischen Alanin und 2-Aminobuttersäure.

Konzentrationsberechnungen erfolgten mit aus Testläufen von Standardsubstanzen ermittelten Faktoren.

b) Zur Bestimmung von Tryptophan wurde nach der von Berridge u. Mitarb. (1971) angegebenen Methode auf der 30 cm-Säule verfahren: Säulentemperatur 55°, Natriumcitratpuffer pH 5,26, 0,35 molar für Natrium. Dabei zeigte sich eine gute Abtrennung von Tryptophan von Kreatinin und den Hydroxylysinen.

Wiederfindungsversuche durch Zugabe von definierten Tryptophanmengen zu demselben Plasma (25, 50 und 100 nMol/ml Plasma) ergaben eine Wiederfindungsrate (n = 5) von 95,2%, 91,2% bzw. 93,6%.

c) Eine säulenchromatografische Abtrennung der Pipecolinsäure von Cystin und Homocitrullin plus Saccharopin ist möglich durch Verzögerung des Umschaltens vom pH 3,25 auf den pH 4,25 - Puffer (Gatfield u. Mitarb., 1968), durch Änderung der ersten Säulentemperatur auf 50° (Zacharius und Talley,1956) oder durch Benutzen eines pH 3,11 - Puffers, wodurch Pipecolinsäure zwischen Valin und Cystin erscheint. Die Empfindlichkeit ist aber zu gering, um Pipecolinsäure in praktikablen Auftragsmengen von Plasma bestimmen zu können (die molare Extinktion betrug bei uns nur etwa 2 % der der neutralen Aminosäuren). Deshalb wurde Pipecolinsäure unabhängig kolorimetrisch bestimmt.

4.1.5. Darstellung und Identifizierung von 2-Aminoadipinsäure

Die Abtrennung der Fraktion der sauren und neutralen Aminosäuren von der der basischen Aminosäuren geschah nach der Methode von Kakimoto und Akazawa (1970) auf einer Amberlite CG 120 I-Säule (3 x 10 cm). Das Pyridineluat mit den sauren und neutralen Aminosäuren wurde nach Trocknung im Rotationsverdampfer in pH 2,2 Natriumcitratpuffer aufgenommen und am Präparativsystem BC 300 (LKB, München) (Säule 2 x 150 cm, Harz AG3-X4A; Bio Rad, München) mit

Natriumacetatpuffer (pH 3,25, 0,2 M Natrium) fraktioniert. Fraktionen von jeweils 18 ml wurden gesammelt und einzeln auf ninhydrinpositive Substanzen getestet.

2-Aminoadipinsäure wurde mit ca. 1850 ml eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden gemeinsam auf einer Dowex 50 X8 $[H^+]$-Säule nach der Methode von Carsten (1952) entsalzt. Bei säulenchromatografischer Analyse zeigten sich neben der vermuteten 2-Aminoadipinsäure geringe Verunreinigungen mit Glutaminsäure, Glycin und Alanin.

Daher wurde zur weiteren Abtrennung eine eindimensionale präparative Dünnschichtchromatografie auf Kieselgelfertigplatten, Schichtdicke 2 mm (Merck, Darmstadt) mit dem Fließmittel Äthanol/Wasser (83/17; V/V) angeschlossen. Die Lokalisation der Aminosäuren erfolgte durch Anfärbung des Plattenrandes mit 0,2 % Ninhydrinlösung in Aceton/Eisessig (80/20; V/V). Die Kieselgelschicht wurde in der entsprechenden Höhe abgekratzt, in Wasser gelöst und zentrifugiert. Der klare Überstand wurde am Rotationsverdampfer eingetrocknet und in einer kleinen Menge Wasser wieder aufgenommen.

Die Reinheit der isolierten Substanz wurde mit den angegebenen Methoden in ein- und zweidimensionaler Dünnschichtchromatografie gegen die Referenzsubstanz 2-Aminoadipinsäure und durch säulenchromatografische Trennung am Autoanalyser und Beobachtung der Verschiebung ihrer Retentionszeit bei 30, 34 und 37° im Vergleich zu authentischer 2-Aminoadipinsäure geprüft.

Die endgültige Identifizierung erfolgte nach nochmaliger Reinigung der gelösten Substanz über eine Dowex 50W X8-Säule und Elution mit 20 ml 2 M Ammoniumhydroxyd, Trocknung am Rotationsverdampfer, durch direct inlet-Massenspektrometrie.

4.1.6. Darstellung von Pipecolinsäure

4.1.6.1. Vorversuche

a) Wässrige Pipecolinsäurelösung (2 mg/ml) wurde 1:1 mit 0,6 N Trichloressigsäure versetzt. Die Auftragsmenge auf eine Dowex 50W X2

$[H^+]$-Säule (2 x 25 cm) entsprach 10 mg Pipecolinsäure. Nach Waschen mit 100 ml H_2O wurde eluiert mit 150 ml 1 N HCl, 150 ml 1,5 N HCl, 150 ml 2 N HCl (Grove und Henderson, 1968). 10 ml-Fraktionen wurden aufgefangen und einzeln mit Ninhydrin (0,15 % in Eisessig) getestet. Eine positive Reaktion (Extinktion gemessen bei 560 nm) ergab sich in den Fraktionen 340 bis 370 ml.

b) Mit 0,6 N Trichloressigsäure 1:1 enteiweißtes Precinorm S (Boehringer, Mannheim, Charge Nr. 612) ergab bei gleicher Fraktionierung keine positive Reaktion mit saurem Ninhydrin. Precinorm S enthält jedoch freie Aminosäuren, wie durch säulenchromatografische Analyse bestimmt wurde.

c) Bei Fraktionierung von Precinorm S, dem 0,5 mg/ml Pipecolinsäure zugesetzt wurde, ergab sich wiederum eine positive Reaktion mit saurem Ninhydrin in den Fraktionen 340 - 370 ml. Die Hälften der Volumina der Fraktionen 310 - 400 ml wurden einzeln am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und in kleine Mengen H_2O wieder aufgenommen. Der Rest der Fraktionen 310 - 400 ml wurde zusammen am Rotationsverdampfer eingeengt und ebenfalls in H_2O aufgenommen.

Eindimensionale dünnschichtchromatografische Auftrennung auf Celluloseplatten erfolgte mit den Systemen:

1. Pyridin/Dioxan/Ammoniak/Wasser (35/35/15/15; V/V)
2. n-Butanol/Aceton/Eisessig/Wasser (35/35/10/20; V/V)
3. n-Butanol/Eisessig/Wasser (12/3/5; V/V).

Die Anfärbung geschah mit 0,3 % Ninhydrin, 0,2 % Isatin in 70 % Äthanol, dem 1 Volumen Eisessig pro 4 Volumina zugesetzt wurde.

Es ergaben sich folgende R_f-Werte, wobei die entsprechende Bande die für Pipecolinsäure typische leuchtend rot-violette Färbung aufwies:

	System 1	System 2	System 3
Pipecolinsäurelösung	0,368	0,550	0,368
Precinorm + Pipecolinsäure, Fraktion 350 ml	0,368	0,563	0,355
Precinorm und Pipecolinsäure, Fraktionen 310-400 ml	0,382	0,550	0,382
Precinorm, Fraktionen 310-400 ml	keine Bande	keine Bande	keine Bande

Zweidimensionale dünnschichtchromatografische Auftrennung erfolgte auf 10 x 10 cm Zelluloseplatten mit dem System 1 in der ersten und System 2 in der 2. Dimension. Dabei ergab sich nur bei der Fraktion 350 ml von Precinorm plus Pipecolinsäure ein typisch gefärbter Fleck, dessen R_f-Werte von 0,588 in der ersten Dimension und 0,60 in der 2. Dimension mit denen von Pipecolinsäure (0,588 bzw. 0,594) übereinstimmten. Gleichzeitiges Auftragen dieser Fraktion mit Pipecolinsäurelösung zeigte eine Intensivierung des Pipecolinsäurefleckes.

Fraktionen von Precinorm ohne Zusatz ergaben keinen typischen Fleck.

Säulenchromatografie am Autoanalyser unter Verlängerung der Umschaltzeit auf Puffer 2 und 55° ergab im Falle von Fraktion 350 ml einen Peak mit dem für Pipecolinsäure typischen hohen 440/570 nm Absorptionsquotienten.

4.1.6.2. Pipecolinsäure im Patientenserum

Nach kolorimetrischer Bestimmung der Pipecolinsäure (siehe Methodik 4.1.6.3.) wurden die restlichen Serummengen der Pipecolinsäurebelastung (ca. 9 ml) für sich und die der Lysin- und Hydroxylysinbelastung (ca. 20,6 ml) vereinigt und nach Enteiweißung mit Trichloressigsäure in analoger Weise fraktioniert.

Meßbare Extinktionsänderungen bei 560 nm nach Zugabe von saurem Ninhydrin traten für die Fraktionen der Pipecolinsäurebelastung zwischen 290 und 380 ml, nicht jedoch in denen der Lysin- und Hydroxylysinbelastung auf.

Die Fraktionen 290 - 380 ml der Pipecolinsäurebelastung und die Fraktionen 250 - 370 ml der Lysin- und Hydroxylysinbelastung wurden jeweils vereinigt, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und in 4 ml H_2O wieder aufgenommen. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt.

Eine zweite Fraktionierung auf einer Dowex 50W X2-Säule (H^+-Form , 1 x 30 cm) wurde in der oben angegebenen Weise angeschlossen. Die

Fraktionen à 10 ml wurden einzeln über NaOH im Exsikkator eingeengt und in jeweils 0,5 ml H_2O aufgenommen.

Zweidimensionale dünnschichtchromatografische Auftrennung von 5 µl aus jeder Fraktion und Anfärbung mit Ninhydrin/Isatin erfolgte in der oben angegebenen Weise.

Die Fraktionen 170 und 180 ml der Pipecolinsäurebelastung wurden auf Präparativ-Kieselgelplatten (Merck, Darmstadt; 60F254, Schichtdicke 2 mm) im Vergleich zu wässriger Pipecolinsäurelösung chromatografiert (Fließmittel: Äthanol/H_2O; 83/17; V/V; zweimal 16 cm). Nach Anfärben der Ränder mit Ninhydrin (0,2 % in Eisessig/H_2O; 20/80) wurde die Kieselgelschicht in entsprechender Höhe ausgekratzt und in H_2O aufgeschwemmt. Der Überstand wurde abzentrifugiert, am Rotationsverdampfer eingeengt und in 0,5 ml H_2O aufgenommen.

Von dieser Lösung wurden kleine Aliquots von 5 bzw. 6 µl wiederum eindimensional und zweidimensional auf Zelluloseplatten chromatografiert.

Eine Menge von 0,1 ml wurde mit 2,9 ml Ninhydrin (0,15 % in Eisessig) versetzt und das Spektrum am Spektralphotometer gemessen.

4.1.6.3. Kolorimetrische Messung der Pipecolinsäure

Hierbei wurde in Abänderung der von Thomas u. Mitarb. (1975) angegebenen Methode, die sich auf Untersuchungen von Piez u. Mitarb. (1956) bezieht, wie folgt verfahren:
0,1 ml Serum werden mit 0,1 ml 0,6 N Trichloressigsäure enteiweißt und zentrifugiert. Zu 0,1 ml des Überstandes werden 2,9 ml 0,15%ige Ninhydrinlösung in Eisessig gegeben und das Gemisch im Wasserbad bei 100° dreißig Minuten lang gekocht. Die Ninhydrinlösung muß frisch angesetzt sein. Die Probe wird 5 bis 10 Minuten in Eiswasser abgekühlt und ihre Extinktion innerhalb 30 Minuten am Spektralphotometer bei Raumtemperatur bei 560 und 515 nm gemessen. Die Pipecolinsäuremenge in der Probe errechnet sich unter Einsetzen der parallel bestimmten Extinktionen für 1 ng Pipecolinsäure und 1 ng

Prolin bei den beiden genannten Wellenlängen und Korrektur für den Leerwert nach den von Silberstein u. Mitarb. (1956) angegebenen Formeln:

$$E_{560} = A \times Pi + B \times Pr$$
$$E_{515} = C \times Pi + D \times Pr$$

wobei E_{560} = Extinktion der Probe bei 560 nm
E_{515} = Extinktion der Probe bei 515 nm
A = Extinktion von 1 ng Pipecolinsäure bei 560 nm
B = Extinktion von 1 ng Prolin bei 560 nm
C = Extinktion von 1 ng Pipecolinsäure bei 515 nm
D = Extinktion von 1 ng Prolin bei 515 nm
Pi = Pipecolinsäure in der Probe
Pr = Prolin in der Probe

bedeuten.

Das ergibt die beiden Möglichkeiten:

$$Pi = \frac{D \times E_{560} - B \times E_{515}}{D \times A - B \times C} \quad \text{oder} \quad Pi = \frac{B \times E_{515} - D \times E_{560}}{B \times C - D \times A}$$

Basis dieser Bestimmungsmethode sind folgende Vorversuche und Tatsachen:
Bei Reaktion mit in Eisessig gelöstem Ninhydrin geben die meisten Monoaminosäuren, Hydroxyprolin und Ammoniak keine, oder nur eine geringe Farbreaktion, im Gegensatz zu Prolin und Pipecolinsäure (Schweet, 1954) und einigen anderen Iminosäuren (Piez u. Mitarb., 1956). Die Spektren wässriger Pipecolinsäure- und Prolinlösungen nach Reaktion mit in Eisessig gelöstem Ninhydrin zeigen zwei deutlich unterscheidbare Extinktionsmaxima bei 560 bzw. 515 nm (Abbildung 6).

Extinktionsmessungen mit wässrigen Lösungen von ansteigender Konzentration von Pipecolinsäure und Prolin (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0 mg/100 ml) bei Einsatz von jeweils 0,1 ml in die Reaktion mit 2,9 ml 0,15 % Ninhydrin in Eisessig ergaben einen linearen Anstieg der Extinktion mit guter Reproduzierbarkeit (Abbildungen 7, 8 und 9). Diese Linearität bleibt erhalten, wenn Pipecolinsäure, Prolin oder beide zusammen Precinorm S oder menschli-

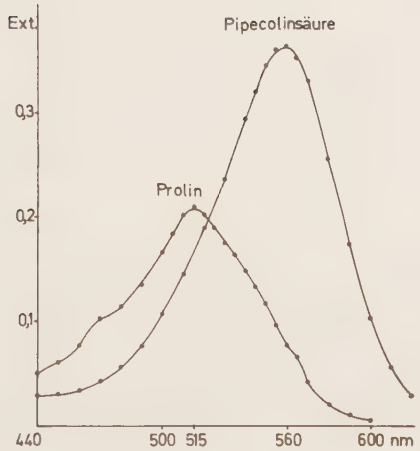


Abbildung 6 : Spektrum von Prolin und Pipecolinsäure in wässriger Lösung nach Reaktion mit 0,15% Ninhydrin in Eisessig

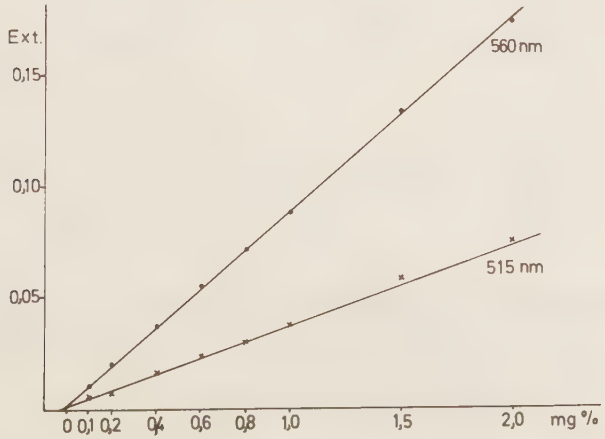


Abbildung 7 : Extinktionen bei 515 und 560 nm von wässrigen Lösungen von Pipecolinsäure verschiedener Konzentrationen

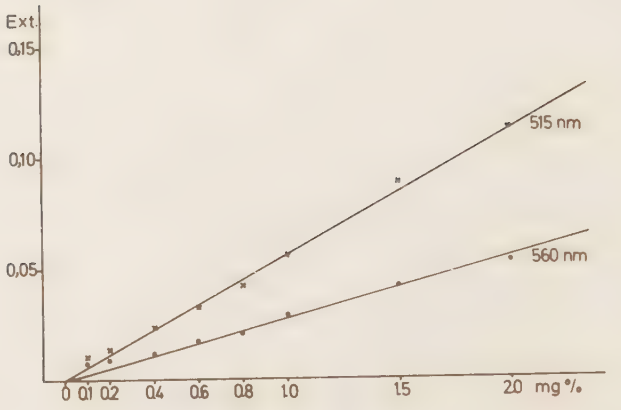


Abbildung 8 : Extinktionen bei 515 nm und 560 nm wässriger Lösungen von Prolin verschiedener Konzentrationen

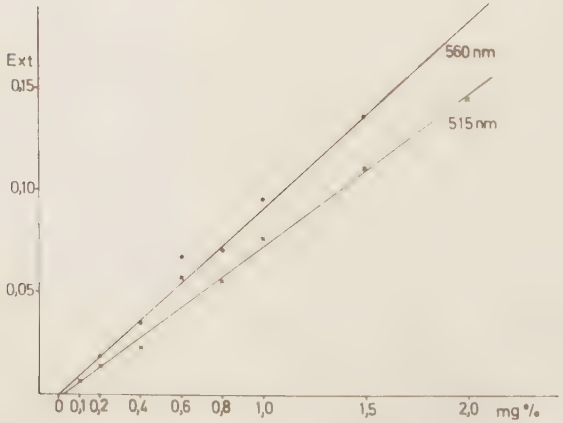


Abbildung 9 : Extinktionen bei 515 nm und 560 nm von wässrigen Lösungen von Pipecolinsäure plus Prolin verschiedener Konzentrationen

chem Serum zugesetzt werden (Abbildungen 10, 11, 12 u. 13).

Bei Prolinkonzentrationen, die über 0,4 uMol/ml liegen, wird allerdings die Wiederfindung von Pipecolinsäure in niedrigen Konzentrationen negativ beeinflußt. Sie betrug für 2 mg/100 ml (= 0,121 mM/l) Pipecolinsäure in Anwesenheit von 1 mg/100 ml (= 0,087 mM/l) Prolin 91 %, von 4 mg/100 ml (= 0,348 mM/l) Prolin 86 %, von 5 mg/100 ml (= 0,434 mM/l) Prolin 83 % und von 10 mg/100 ml (= 0,869 mM/l) Prolin nur noch 62 %.

Die Annahme, daß Precinorm S keine Pipecolinsäure in mit dieser Methode meßbaren Konzentrationen enthält, wurde bestätigt durch die Fraktionierung von mit 0,6 N Trichloressigsäure enteiweißtem Precinorm an einer Dowex 50W X2-Säule wie unter 4.1.6.1. beschrieben. Precinorm S enthält 0,013 mM/l Prolin.

In Abbildung 14 ist die Regressionsgerade dargestellt, die sich aus zehn Bestimmungen der Extinktion bei 560 nm für die acht gewählten Konzentrationsbereiche von Pipecolinsäure in Precinorm S errechnet. Die Mittelwerte der Einzelbestimmungen und der Bereich der doppelten Standardabweichung sind eingetragen. Die Bestimmungen wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt.

Die Wiederfindungsraten von zugesetzter Pipecolinsäure bzw. von zugesetztem Prolin berechnet nach der oben angegebenen Formel in dem angegebenen Meßbereich sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1 : Wiederfindungsraten von Pipecolinsäure und Prolin in Precinorm in % der eingesetzten Menge aus vier Testreihen.

	eingesetzt	berechnet	wiedergefunden
Pipecolinsäure	0,2 mg%	0,22 mg%	110 %
	0,6 mg%	0,63 mg%	105 %
	1,0 mg%	0,99 mg%	99 %
	2,0 mg%	1,96 mg%	98 %
Prolin	0,2 mg%	0,15 mg%	75 %
	0,6 mg%	0,39 mg%	65 %
	1,0 mg%	0,85 mg%	85 %
	2,0 mg%	1,58 mg%	79 %

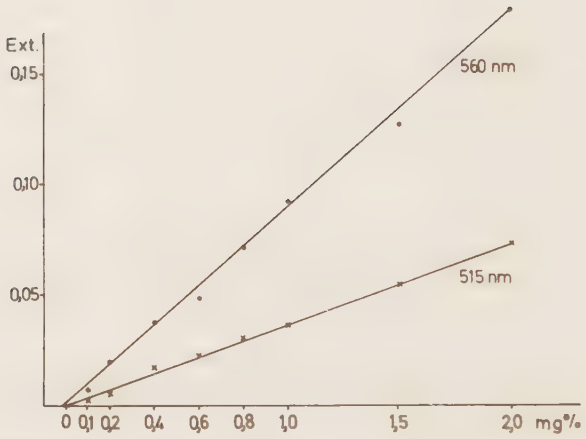


Abbildung 10 : Extinktionen bei 515 und 560 nm von Precinorm S, dem Pipecolinsäure in ansteigender Konzentration zugesetzt wurde

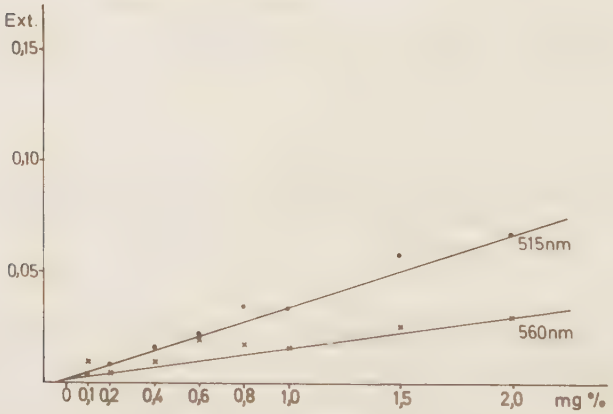


Abbildung 11: Extinktionen bei 515 und 560 nm von Precinorm S, dem Prolin in ansteigender Konzentration zugesetzt wurde

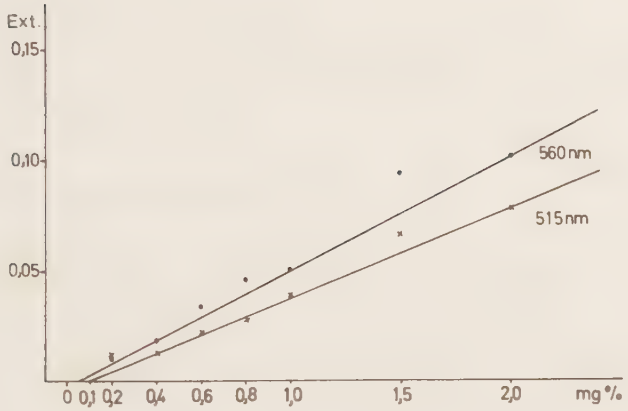


Abbildung 12 : Extinktionen bei 515 nm und 560 nm von Precinorm S, dem Pipecolinsäure und Prolin in ansteigender Konzentration zugesetzt wurde

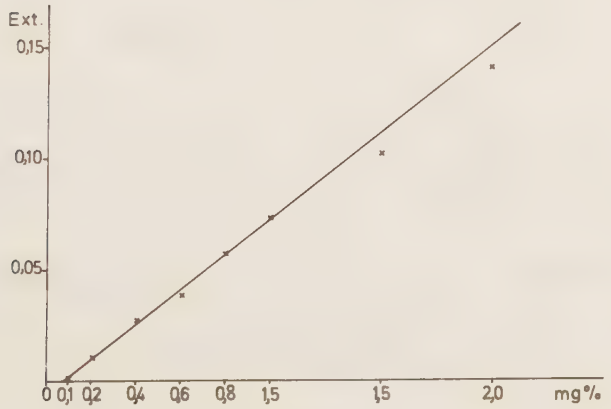


Abbildung 13 : Extinktion bei 560 nm von menschlichem Serum, dem Pipecolinsäure in ansteigender Konzentration zugesetzt wurde

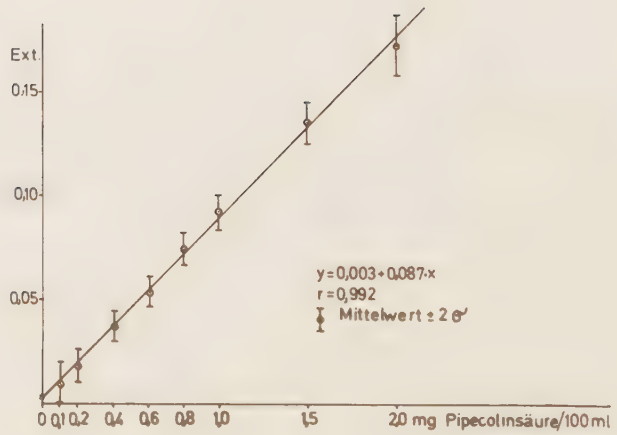


Abbildung 14 : Mittelwerte und 2-Sigmabereich der Extinktion bei 560 nm von Precinorm S, dem Pipecolinsäure in ansteigender Konzentration zugesetzt wurde (n = 10; Regression r = 0,992)

4.1.7. Gaschromatografie organischer Säuren

Diese Untersuchungen wurden während meines Gastaufenthaltes im Labor von Dr. S.K. Wadman, Het Wilhelmina Kinderziekenhuis, Utrecht, durchgeführt.

4.1.7.1. Nichtflüchtige organische Säuren

a) freie Säuren

Diese wurden nach der von Wadman u. Mitarb. (1971) angegebenen Methode bestimmt, mit kleineren Modifikationen: 5 ml Urin (1 ml Serum) werden nach Zugabe von 10 mg Ascorbinsäure, 5 ml gesättigter Kochsalzlösung und 0,5 mg 4-Phenylbuttersäure (0,1 mg bei Serum) und Ansäuerung auf pH 2,0 mit konzentrierter Salzsäure zweimal mit jeweils 20 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Die Extrakte werden nach Trocknen mit Natriumsulfat am Rotationsverdampfer bei 30° evaporiert. Trimethylsilylierung erfolgt durch Zugabe von 0,5 ml (0,1 ml für Serum) einer N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid-Chloroform (1:3; V/V)-Lösung bei 30° im Paraffinbad über 20 Minuten. Hiervon werden 0,001 ml mit einer Hamilton-Mikroliterspritze (10 µl) injiziert, entsprechend 0,01 ml Urin bzw. Serum.

b) konjugierte Säuren

In einigen Fällen wurden die nichtflüchtigen Säuren nach alkalischer bzw. saurer Hydrolyse eventueller Konjugate bestimmt:

Zu 5 ml Urin werden nach Zugabe von 0,5 mg 4-Phenylbuttersäure 5,5 ml 11N Natronlauge oder 12N Salzsäure gegeben. Die Probe wird in einem Pyrexglas mit Schraubverschluß 3 Std. auf 100° erhitzt, danach auf unter 5° abgekühlt. Danach wird extrahiert wie oben angegeben.

Ein Gaschromatograf F & M 810 mit zwei Säulen und zwei Flammenionisationsdetektoren angeschlossen an einen Hewlett-Packard Integrator 3370A wurde benutzt.

Säulen: Stahl, 8 Fuß x 1/8 Inch, gefüllt mit Chromosorb W AW DMCS, 100-120 mesh, belegt mit 5 % GE SE-52.

Temperaturen: Einlaßtemperatur 190°, Detektor 220°, Säulentemperatur 75° isothermal über 10 Minuten, dann 75 bis 220° mit Anstieg

um 2°/Min., 220° isothermal über 10 Minuten.

Trägergas: Stickstoff (27 ml/Min.)

Wasserstoff 28 ml/Min., Luft 450 ml/Min.

Bereich 10^{2}, Attenuierung 8.

Papiervorschub 0,5 Inch/Min.

Die vorläufige Identifizierung geschieht mit Hilfe der Retentionszeit bezogen auf den internen Standard 4-Phenylbuttersäure. Die Konzentrationsberechnung erfolgt anhand von Kalibrierungskurven mit Korrektur durch den internen Standard.

4.1.7.2. Flüchtige organische Säuren

Hierzu wurde entsprechend der von Duran (1974) beschriebenen Methodik verfahren.

a) freie Säuren

5 ml Urin (1 ml Serum) plus 0,5 mg (0,1 mg) n-Valeriansäure plus 5 ml gesättigte Kochsalzlösung werden mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2,0 angesäuert und zweimal mit je 20 ml Diäthyläther extrahiert. Die Extrakte werden mit 2 ml 0,2 N methanolischer Natronlauge versetzt und am Rotationsverdampfer bei 40° evaporiert. Der Überrest wird mit wenig Methanol in ein kleines Schliffstopfenglas überführt und wiederum bis fast zur Trockne eingeengt. Nach Ansäuerung mit 0,1 ml 6 N Salzsäure werden 0,5 (0,1) ml Diäthyläther zugegeben, am Whirlimix aufgeschüttelt und anschließend mit ca. 200 mg Natriumsulfat getrocknet. Ein Mikroliter der Ätherphase (entsprechend 0,01 ml Urin bzw. Serum) werden mit einer Hamilton-Mikrolitherspritze (10 µl) injiziert.

b) konjugierte Säuren

Alkalische Hydrolyse mit 5,5 ml 11 N Natronlauge nach Zugabe des internen Standards n-Valeriansäure wird bei 100° über 3 Std. durchgeführt. Nach Abkühlen der Probe unter 5° wird mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert und dann extrahiert.

Benutzt wurde ein Becker 420-Gaschromatograf mit zwei Säulen und zwei Flammenionisationsdetektoren und ausgerüstet mit einer Programmiereinheit (PX) für mehrfach-lineare Temperaturprogramme, angeschlossen an einen Hewlett-Packard 3370 A-Integrator.

Säulen: Stahl, 2,4 m x 2 mm innerer Durchmesser, gefüllt mit Chromosorb W AW DMCS (100 - 120 mesh) belegt mit 5 % Neopentylglykoladipat und 2 % Phosphorsäure.

Temperaturen: Einlaßtemperatur 190°, Detektoren 210°, Säulentemperatur 60°, Anstieg um 2,5°/Min. über 20 Minuten, gefolgt von 10°/Min. über 6 Minuten bis 170°, isotherm über 27 Minuten.

Trägergas: Stickstoff 35 ml/Min.

Wasserstoff 25 ml/Min. und Luft 240 ml/Min.

Bereich 10^2, Attenuierung 2.

Papiervorschub 0,5 cm/Min.

Die vorläufige Zuordnung geschieht mit Hilfe der Retentionszeiten in Relation zum internen Standard n-Valeriansäure.

Zur Konzentrationsberechnung dienen auch hier Kalibrierungskurven korrigiert auf den internen Standard.

4.1.7.3. Gaschromatografie-Massenspektrometrie

Die Identifizierung fraglicher Substanzen erfolgte an einem Gaschromatografen-Massenspektrometer (Jeol D-100) mit denselben Säulen und Temperaturprogrammen wie für die normale Gaschromatografie und Helium als Trägergas, oder im Falle der 2-Aminoadipinsäure durch direct inlet-Massenspektrometrie (75 eV, Temperatur der Ionenkammer 140 - 150°).

4.1.8. Degradationsversuche in Fibroblasten

Diese Untersuchungen wurden im Rahmen der Aufklärung der Stoffwechseldefekte bei den beiden Patienten von Dr. U. Wendel aus der Kinderklinik C durchgeführt.

Es wurden nur intakte Fibroblasten in Monolayerkulturen verwandt.

Die Degradation verschiedener ^{14}C-markierter Substrate wurde mittels Bestimmung des entstehenden $^{14}CO_2$ gemessen (Wendel u. Mitarb., 1975) und mit der in Fibroblasten von Normalpersonen verglichen.

Die folgenden Substrate wurden getestet:

[1-^{14}C]-2-D,L-Aminoadipinsäure (56 mC/mMol, Amersham, England);
[1-^{14}C]-2-Oxoadipinsäure (56 mC/mMol, durch oxydative Desaminierung mit D- und L-Aminosäurenoxydase - Boehringer, Mannheim - aus [1-^{14}C]-D,L-Aminoadipinsäure gewonnen);
[1,5-^{14}C]-Glutarsäure (6,1 mC/mMol - ICN, USA);
[U-^{14}C]-L-Leucin (10 mC/mMol - Amersham);
[U-^{14}C]-L-Valin (10 mC/mMol - Amersham);
[U-^{14}C]-L-Isoleucin (312 mC/mMol - Amersham);
[U-^{14}C]-2-Oxoisocapronsäure (10 mC/mMol, durch oxydative Desaminierung mit L-Aminosäurenoxydase aus [U-^{14}C]-L-Leucin gewonnen);
[U-^{14}C]-2-Oxoisovaleriansäure (10 mC/mMol, durch oxydative Desaminierung mit L-Aminosäurenoxydase aus [U-^{14}C]-L-Valin gewonnen);
[1-^{14}C]- Brenztraubensäure (13,1 mC/mMol - Amersham).

Die Ergebnisse wurden angegeben in pMol $^{14}CO_2$, gebildet pro 10 /ug Zellprotein in vier Stunden.

4.2. PATIENTEN

4.2.1. ALPHAKETOADIPATURIE

Die Diagnostik dieser Stoffwechselstörung in der Oxidation von 2-Oxoadipinsäure geschah offenbar simultan mit der des von Wilson u. Mitarb. (1973 und 1975) berichteten Falles in den Jahren 1973 bis 1977 an einer Patientin unserer Klinik.

4.2.1.1. Familienanamnese

Die Patientin S.G. ist uneheliches Kind einer debilen 20jährigen Mutter. Der Vater ist nicht bekannt.

Die Großeltern der Patientin von der mütterlichen Seite leben, sind gesund, und soweit beurteilbar, normal intelligent. Außer der Mutter C.G. der Patientin haben sie zwei weitere Kinder, einen ein Jahr älteren, ebenfalls retardierten Sohn mit Sprachstörungen und eine drei Jahre jüngere Tochter, die einen Beruf erlernt hat.

Die Mutter C.G. wurde mit 15 Monaten in der Kinderklinik Düsseldorf stationär durchuntersucht wegen geistiger und motorischer Retardierung (Sitzen mit 10 Monaten, Stehen mit 13 Monaten, kein Sprechen), bzw. eines Entwicklungsstillstandes seit zwei Monaten. Das Kind war immer sehr adipös, schlaff und ruhig. Ein Pneumenzephalogramm zeigte eine mäßige Erweiterung beider Seitenventrikel. Der Liquoreiweißgehalt war normal.

Mit 21 und 30 Monaten wurde sie nochmals stationär wegen einer Pleuritis bzw. obstruktiven Bronchitis behandelt. Mit 21 Monaten war sie auffallend unbeteiligt an ihrer Umgebung, sprach noch nicht. Die dicken Fettpolster waren teigig, die Muskulatur hypoton. Mit 30 Monaten sprach sie einzelne Worte und konnte laufen. Geistig erschien sie nicht altersgerecht entwickelt. Es besteht ein Strabismus convergens. C.G. besuchte 4 Jahre die Sonderschule. Seit dem 15. Lebensjahr neigte sie zu Kollapszuständen. In der Schwangerschaft traten außer Blutdruckerhöhungen und mäßiger Hyperemesis in den letzten Schwangerschaftsmonaten keine Besonderheiten auf.

4.2.1.2. Krankengeschichte

S.G. wurde spontan am fraglichen Endtermin geboren. Geburtsgewicht 2.950 g, Länge 50 cm, Apgarnote 9 nach 1 Minute. Es handelte sich um ein sogenanntes "Kollodiumbaby". In der ersten Nacht soll ein einmaliger Krampfanfall aufgetreten sein. Am 3. Lebenstag wurde sie wegen der Hautveränderungen in unsere Klinik verlegt (Abb.15).

Abbildung 15 : Die Patientin S.G. im Alter von 36 Stunden

Sie zeigte generalisierte großlamelläre Schuppung auf rotem Grund, die besonders den Rumpf betraf und in den Hautfalten superinfiziert und nässend war. Beiderseits bestanden Vier-Finger-Furchen. Unter Inkubatortherapie und lokaler Behandlung der Haut mit Salizylsäure gedieh sie sehr gut.

Die neurologische und augenärztliche Untersuchung mit vier Wochen sowie ein Echoenzephalogramm waren normal. Röntgenologisch fand sich eine Brachymesophalangie und Klinodaktylie des 5. Fingers beiderseits.

Ein im Alter von sechs Wochen durchgeführtes Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen ergab in der Dünnschichtchromatografie

neben einer allgemeinen Hyperaminoazidurie einen auffallenden Fleck in der Position von 2-Aminoadipinsäure und war Anlaß zu weitergehender Diagnostik.

Die Diagnostik und alle Versuche der diätetischen oder medikamentösen Behandlung wurden behindert durch uneinsichtiges Verhalten der Familie, die das Kind öfters gegen ärztlichen Rat aus der Klinik nahm, und die empfohlenen Maßnahmen zu Hause nicht durchführte.

S.G. war bis Mitte 1977 insgesamt achtmal in stationärer Behandlung und wurde zwischenzeitlich gelegentlich auch ambulant vorgestellt, meist wegen akuter Schübe von entzündlichen Hautveränderungen.

Dabei konnte ihre neurologische und geistige Entwicklung einigermaßen gut verfolgt werden.

Die muskuläre Hypotonie blieb sehr stark ausgeprägt, wobei die Eigenreflexe lebhaft und seitengleich auslösbar waren, pathologische Reflexe jedoch nicht auftraten. S.G. ist auch heute noch bewegungsarm.

Ihre Entwicklung ist im folgenden tabellarisch dargestellt:

5 Monate	Kopfkontrolle ∅, Stehbereitschaft ∅, Abstützreaktion ∅, ATNR +, Landaureaktion + , lacht
13 Monate	Sitzen ∅, Stehbereitschaft ∅, Abstützreaktion ∅ Kopfheben aus Bauch- oder Rückenlage ∅ Rotation (+), Traktionsversuch (+)
15 Monate	Kopfheben aus Bauchlage + Abstützreaktion (+), Stehbereitschaft ∅ , unsicheres Sitzen mit Lendenkyphose
16 Monate	Lacht laut, Stehbereitschaft ∅ Traktionsversuch + , sitzt frei mit Lendenkyphose Bauchlage: hebt Kopf und Oberkörper Krabbeln ∅ , spricht nichts
22 Monate	Stehbereitschaft +

36 Monate Stehen mit Stütze, spricht "Mama"
Denver-Test: Entwicklung entsprechend etwa 8-10 Mon.

45 Monate Rhythmisches schrilles Schreien
Stehen mit Anhalten

49 Monate Laufen mit Anhalten
Kriechen nur rückwärts
Greifen unsicher und ungeschickt.

S.G. wirkt pastös, insbesondere Hand- und Fußrücken tragen nicht wegdrückbare Polster, die Längenentwicklung bewegt sich auf der 10. - 25. Perzentile, die Gewichtsentwicklung auf der 3. - 10. Perzentile, bezogen auf das Lebensalter. Ihre Haut ist stark schuppend, besonders im Gesicht, hinter den Ohren und in den großen Körperfalten und neigt zu entzündlichen Veränderungen. Die histologische Diagnose einer im Alter von 6 Monaten entnommenen Hautbiopsie lautete: Ichthyosis congenita. Eine ständige lokale Behandlung mit Salben und Bädern ist erforderlich.

Das Kind ist freundlich, neigt zu stereotypen Bewegungen.

4.2.1.3. Allgemeine Untersuchungsbefunde

Elektroenzephalografie: 2 1/2 Monate: fragliche Seitendifferenz;
13 Monate, 39 Monate, 49 Monate: normal

Echoenzephalografie : 2 1/2 Monate: normal,
13 Monate: Ventrikelerweiterung.

Funduskopie und Beurteilung der brechenden Medien: mit 6 Monaten, 39 Monaten, 49 Monaten, jeweils normal. Gelegentlich zeigt S.G. unkoordinierte Augenbewegungen, sie blinzelt auffallend.

Motorische Nervenleitgeschwindigkeit und Elektromyografie sind mit 6 Monaten: normal.

Röntgenaufnahmen des Schädels ergeben wiederholt keine Besonderheiten.

Das Knochenalter (bestimmt an der linken Hand) zeigt eine deutliche Retardierung:
Mit 13 Monaten beträgt es 10 Monate,
mit 39 Monaten " " 15 Monate,
mit 46 Monaten " " 18-24 Monate,
mit 49 Monaten " " 30 Monate.

Die Aufnahme des Beckens im Alter von
39 Monaten zeigt Coxae valgae bds.

Folgende Laboruntersuchungen ergaben normale Befunde:

Rotes und weißes Blutbild, bis auf eine vorübergehende mäßige Anämie;
Elektrolyte im Plasma, einschließlich Kalzium und Phosphat;
Gesamteiweiß im Serum, Elektrophorese;
Blutglukose;
Transaminasen, alkalische Phosphatase, γ-Glutamyltranspeptidase;
Laktatdehydrogenase im Plasma;
Harnsäure im Serum;
Eisen und Kupfer im Serum;
Cholesterin, Triglyzeride, Lipoproteinelektrophorese;
Harnstoff-N;
Ammoniak im Blut;
Eiweißgehalt im Liquor cerebrospinalis.

Folgende Laboruntersuchungen zeigten gelegentlich pathologische Befunde:

Säurebasenstatus im Blut: wiederholt kompensierte, selten dekompensierte metabolische Azidose, mit einem Basendefizit bis -11 mÄq/l;
Dinitrophenylhydrazintest im Urin: sehr selten und nur in den ersten Lebensmonaten positiv;

Gerinnungsuntersuchungen zeigten bis zum 2. Lebensjahr immer wieder Verminderungen einzelner Faktoren und Anzeichen eines verringerten Thrombocytenumsatzes, waren später jedoch normal;

Thyroxin im Serum war im Alter von 14 Monaten (6,2 µg/100 ml) noch normal, im Alter von 45 und 46 Monaten (5,3 und 3,9 µg/100 ml) erniedrigt. Gleichzeitig wurde TSH mit 3,0 µU/ml und Trijodthyronin mit 135 ng/100 ml bestimmt. Substitution mit 50 µg Kaliumjodid/Tag über 6 Wochen normalisierte den Thyroxinspiegel.

Mit 13 Monaten wurde der Versuch einer diätetischen Beeinflussung der Stoffwechselstörung durch Restriktion der Eiweißzufuhr auf 1,2 g/kg/Tag unternommen. Gleichzeitig wurde eine regelmäßige krankengymnastische Behandlung eingeleitet. In den folgenden drei Monaten glaubten wir raschere motorische Fortschritte zu sehen.

Mit 17 Monaten begannen wir zusätzlich einen Behandlungsversuch mit Thiamin in hohen Dosen (200 mg/Tag oral). Leider wurden Diät und Thiamin von der Familie nicht sicher beibehalten, so daß Aussagen über einen eventuellen Effekt auf die Entwicklung des Kindes nicht möglich sind.

4.2.1.4. Spezielle biochemische Untersuchungen

Wegen der bekannten Debilität der Mutter und des Krampfanfalles am ersten Lebenstag wurden im Urin von S.G. unsere routinemäßigen Suchtests für angeborene Stoffwechselstörungen durchgeführt, wobei einmal der Dinitrophenylhydrazintest positiv war und sich zum anderen in der dünnschichtchromatografischen Darstellung der Urinaminosäuren ein auffällig intensiver Fleck in der Position von 2-Aminoadipinsäure zeigte.

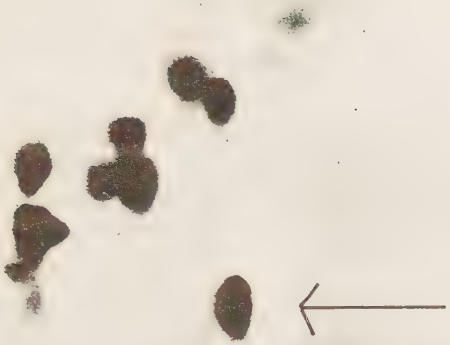


Abbildung 16 : Dünnschichtchromatografie der Urinaminosäuren der Patientin S.G.
Der Pfeil bezeichnet 2-Aminoadipinsäure

Säulenchromatografische Trennung von Plasma- und Urinaminosäuren zeigte bei Verwendung einer Säulentemperatur von 37° einen Peak zwischen Alanin und 2-Amino-n-buttersäure (Abbildung 17).

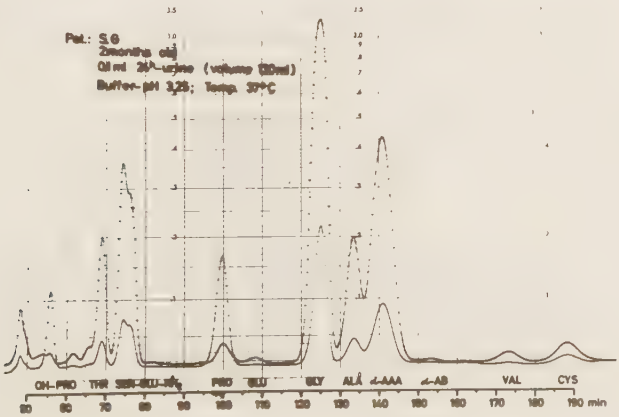


Abbildung 17 : Säulenchromatografische Trennung der Urinaminosäuren der Patientin S.G.
(Gly = Glycin, Ala = Alanin, α-AAA = 2-Aminoadipinsäure, α-AB = 2-Aminobuttersäure)

4.2.1.4.1. Darstellung und Identifizierung von 2-Aminoadipinsäure

Die eindimensionale dünnschichtchromatografische Trennung der durch präparative Säulenchromatografie gewonnenen Urinfraktion mit 2-Aminoadipinsäure ergab identische R_f-Werte mit der Testsubstanz.

Tabelle 2 : R_f-Werte der isolierten Substanz und von Aminosäurentestsubstanzen

	Cellulose-Platten	
	Pyridin/Dioxan/NH_3/H_2O (35:35:15:15; V/V)	n-Butanol/Aceton/ Eisessig/H_2O (35:35:10:20; V/V)
Glycin	0,43	0,30
Alanin	0,59	0,44
2-Aminoadipinsäure	0,19	0,44
Isolierte Substanz	0,19	0,44

Rechromatografie der isolierten Substanz am Aminosäuren-Autoanalyser ergab die folgenden Retentionszeiten bei verschiedener Säulentemperatur:

bei 30° 178 Minuten,
bei 34° 161 Minuten,
bei 38° 150 Minuten.

Die entsprechenden Retentionszeiten für authentische 2-Aminoadipinsäure waren 178, 161 bzw. 150 Minuten, die für 2-Amino-n-buttersäure 179, 170 bzw. 167 Minuten.

Das Massenspektrum der isolierten Substanz war mit dem von 2-Aminoadipinsäure identisch (Abbildung 18).

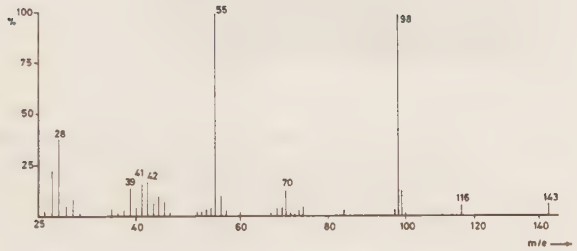


Abbildung 18 : Massenspektrum von 2-Aminoadipinsäure, isoliert aus dem Urin von S.G.
Parent peak M = 161 nicht sichtbar; M-H_2O = 143;
M-COOH = 116; M-H_2O-COOH = 98; $\left[CH_2\text{-}CH\text{=}C\text{=}O\right]^+$ = 55

4.2.1.4.2. Darstellung und Identifizierung von 2-Oxoadipinsäure

Eindimensionale Dünnschichtchromatografie auf Kieselgelplatten der Dinitrophenylhydrazone des Urins von S.G. zeigte bei Vergleich mit denen eines gleichaltrigen Kontrollkindes und mit denen von den Testsubstanzen 2-Oxoadipinsäure, 2-Oxoglutarsäure und Brenztraubensäure einen deutlichen Fleck in der Gegend von 2-Oxoadipinsäure (Abbildung 19).

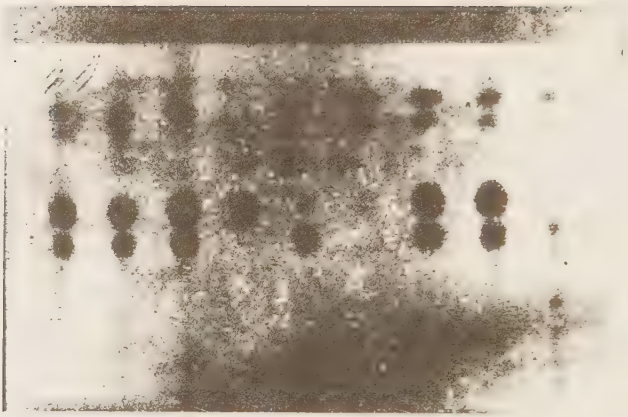


Abbildung 19 : Dünnschichtchromatografie der Dinitrophenylhydrazinderivate des Urins von S.G. im Vergleich zu denen aus einem normalen Urin und zu denen von 2-Oxoadipinsäure, 2-Oxoglutarsäure und Brenztraubensäure. A = Patient S.G., B = 2-Oxoadipinsäure, C = Oxoglutarsäure, D = Brenztraubensäure, E = B + C + D, F = Kontrolle.

Die R_f-Werte dieser durch präparative Dünnschichtchromatografie isolierten Substanz stimmten in zwei Systemen mit denen von 2-Oxoadipinsäure überein (Tabelle 3).

Tabelle 3 : R_f-Werte der Dinitrophenylhydrazone der aus Urin von S.G. isolierten 2-Oxosäure, der 2-Oxosäuren im Urin von S.G. und von Testsubstanzen.

	Kieselgelplatten Benzol/Methanol/ Eisessig (45:5:8; V/V)	Zelluloseplatten n-Butanol/Äthanol/ 1N NH_4OH (130:20:50; V/V)
2-Oxoadipinsäure	0,47	0,19
Testsubstanzen		0,27
2-Oxoglutarsäure	0,40	0,21
Urin von S.G.	0,40	0,21
	0,47	0,27
Isolierte Substanz aus Urin von S.G.	0,47	0,19
		0,27

Die gaschromatografische Analyse der Trimethylsilyl-(TMS)derivate der organischen Säuren des Urins von S.G. zeigte einen Peak mit derselben relativen Retentionszeit (RRT), bezogen auf den internen Standard 4-Phenylbuttersäure, 1,244 wie Oxoadipinsäure (Abbildung 20). Die Konzentration betrug 1459 µMol/l bzw. 1346 µMol/g Kreatinin. Im Serum war 2-Oxoadipinsäure zu keiner Zeit nachweisbar.

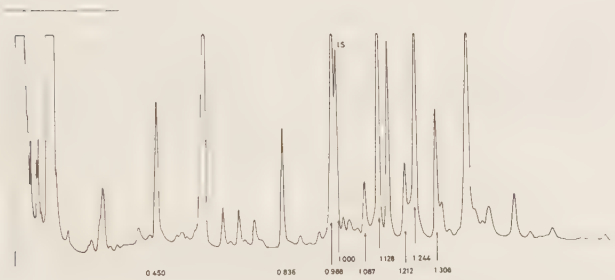


Abbildung 20 : Gaschromatogramm der TMS-Derivate der organischen Säuren im Urin von S.G.

RRT 1,244 = 2-Oxoadipinsäure
RRT 1,212 = 2-Hydroxyadipinsäure
RRT 0,988 = möglicherweise 4-Hydroxycyclohexan-1-carbonsäure
RRT 0,450 = 3-Hydroxybuttersäure
RRT 0,836 = Glutarsäure
RRT 1,087 = 2-Hydroxyglutarsäure
RRT 1,128 = 2-Oxoglutarsäure
RRT 1,308 = Aconitinsäure

Das Massenspektrum des tri-TMS-Derivates war identisch mit dem von 2-Oxoadipinsäure (Abbildung 21).

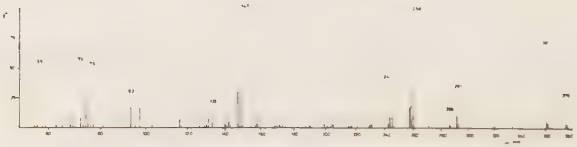


Abbildung 21 : Massenspektrum des TMS-Derivates von 2-Oxoadipinsäure aus dem Urin von S.G.
Parent peak M = 376; M-CH_3= 361; 291 = nicht erklärt; M-TMS OH = 286; M-HCOOTMS = 258; 258-CH_3 = 243.

4.2.1.4.3. Aminosäuren in Plasma, Liquor cerebrospinalis und Urin

Unter altersgerechter Ernährung waren die Lysinspiegel im Plasma und Liquor im Normbereich, 2-Aminoadipinsäure war im Plasma jederzeit nachweisbar, nicht jedoch mit unserer Routinemethodik im Liquor cerebrospinalis. Lysin wurde in Abhängigkeit vom Alter und von der Nahrung normal im Urin ausgeschieden, 2-Aminoadipinsäure jedoch vermehrt. Als Beispiel sind Analysen von Plasma, Liquor und Urin aufgeführt. Plasma und Liquor wurden simultan im Alter

von dreizehn Monaten gewonnen, der 24 Std.-Urin im Alter von zwei Monaten gesammelt (Tabelle 4).

Wie aus der Tabelle hervorgeht, existieren nur unbefriedigende oder keine Literaturangaben über normale Werte der 2-Aminoadipinsäurespiegel und -ausscheidung. Wir selbst konnten sie mit unseren Methoden nicht im Plasma von gesunden Erwachsenen und gesunden Kindern nachweisen.

Ein Zusammenhang zwischen Lysinzufuhr mit der Nahrung und Lysinplasmaspiegeln und 2-Aminoadipinsäureausscheidung im Urin ist in den beiden folgenden Tabellen (5 und 6) demonstriert. Eine Beziehung zwischen 2-Aminoadipinsäureplasmaspiegeln und Lysinaufnahme konnte nicht festgestellt werden. Die Bewertung der Lysinausscheidung in diesem Zusammenhang ist erschwert durch die physiologische Veränderung der tubulären Lysintransportkapazität in den ersten sechs Lebensmonaten.

4.2.1.4.4. Identifizierung und Bestimmung anderer organischer Säuren

Ein unbekannter Peak im Gaschromatogramm (RRT 1,212), dessen Konzentration im Urin etwa ein Drittel der von 2-Oxoadipinsäure betragen dürfte, erwies sich in seinem Massenspektrum als identisch mit 2-Hydroxyadipinsäure (Abbildung 22).

Tabelle 4: Aminosäurenkonzentrationen in Plasma und Liquor cerebrospinalis der Patientin S.G.

	PLASMA		LIQUOR	
	S.G. 13 Mon. /uMol/ml	Normalwerte Armstrong u. Stave (1973) 6 - 18 Jahre /uMol/ml M ± S.D.	S.G. 13 Mon. /uMol/ml	Normalwerte Dickinson u. Hamilton (1966) /uMol/ml M ± S.D.
Taurin	0,038	0,109 ± 0,063		
OH-Prolin	z.w.	0,023 ± 0,012		
Asparaginsäure	0,004	0,006 ± 0,004	0,0005	0,0009 ± 0,0005
Threonin	0,042	0,139 ± 0,032	0,0215	0,0248 ± 0,0101
Serin	0,086	0,124 ± 0,027	0,0601	0,0378 ± 0,0229
Glutamin*	0,398	**0,596 ± 0,066		0,5090 ± 0,044**
Prolin	0,069	0,187 ± 0,058		0,0006 ± 0,0016
Glutaminsäure	0,025		0,0047	0,0070 ± 0,0049
Citrullin	0,016	0,035 ± 0,008	0,0036	0,0020 ± 0,0008
Glycin	0,097	0,232 ± 0,036	0,0070	0,0066 ± 0,0018
Alanin	0,178	0,361 ± 0,088	0,0309	0,0232 ± 0,0094
2-Aminoadipinsäure	0,050			
2-Aminobuttersäure	0,014	0,023 ± 0,007	0,0049	0,0034 ± 0,0019
Valin	0,202	0,223 ± 0,031	0,0243	0,0146 ± 0,0055
Halbcystin	0,085	0,093 ± 0,019		
Methionin	0,017	0,027 ± 0,005	zu wenig	0,0026 ± 0,0016
Isoleucin	0,034	0,067 ± 0,013		0,0044 ± 0,0013
Leucin	0,058	0,127 ± 0,021		0,0109 ± 0,0036
Tyrosin	0,039	0,067 ± 0,011		0,0091 ± 0,0050
Phenylalanin	0,045	0,058 ± 0,008		0,0092 ± 0,0058
4-Aminobuttersäure			0,0022	0,0007 ± 0,0004
Ornithin	0,041	0,049 ± 0,014	0,0053	0,0057 ± 0,0018
Äthanolamin			0,0060	0,0128 ± 0,0057
Lysin	0,062	0,170 ± 0,028	0,0139	0,0187 ± 0,0066
1-Methylhistidin				
Histidin	0,059	0,085 ± 0,010	0,0141	0,0130 ± 0,0044
3-Methylhistidin				
Arginin	0,027	0,089 ± 0,020	0,0193	0,0201 ± 0,0058

* Peak enthält Glutamin + Asparagin, berechnet als Glutamin

** Glutamin ohne Asparagin

(gewonnen im Alter von 13 Monaten) und im Urin (gewonnen im Alter von 2 Monaten)

URIN

2 Mon. /uMol/ml	/uMol/24 Std.	/uMol/Min/1,73m^2	Normalwerte Carver u.Paska (1961) 3-12 Jahre alt /uMol/24 Std.	Brodehl u. Gellissen (1968) 16 Tage - 4 Mon. alt /uMol/Min/1,73m^2 M ± S.D.
0,997	179,48	0,998		
0,038	6,90	0,038		
0,311	55,89	0,311	85 - 250	0,330 ± 0,166
			155 - 540	0,518 ± 0,208
			140 - 780	
				0,205 ± 0,203
0,022	3,97	0,022		
			284 - 1421	1,599 ± 0,792
0,400	71,93	0,400	102 - 439	0,460 ± 0,164
1,325	238,50	1,327	Spur - 8,1***	
			16 - 77	
0,045	8,14	0,045	15 - 51	0,048 ± 0,024
0,154	27,64	0,154	41 - 258	0,088 ± 0,031
}			20 - 95	0,009 ± 0,007
zu wenig			24 - 58	0,010 ± 0,008
}			21 - 83	0,054 ± 0,031
0,124	22,24	0,124	40 - 169	0,090 ± 0,046
0,066	11,81	0,066	24 - 106	0,087 ± 0,048
0,050	9,02	0,050		0,019 ± 0,008
			59 - 307	
0,552	99,37	0,553	64 - 643	0,172 ± 0,071
			24 - 273	
0,542	97,53	0,542	296 - 1286	0,642 ± 0,315
0,025	4,58	0,025	56 - 249	
0,017	3,12	0,017		0,022 ± 0,007

*** Freeman u. Mitarb. (1970): 3 gesunde Kinder zwischen 3 und 7 Monaten

Tabelle 5 : 2-Aminoadipinsäure- und Lysinplasmaspiegel unter verschiedener Lysinzufuhr mit der Nahrung.

	2-Aminoadipinsäure /uMol/ml	Lysin /uMol/ml
Patient S.G.		
Alter 1,5 Monate Eiweißzufuhr 4,1 g/kg/Tag Lysinzufuhr ca.390 mg/kg/Tag	0,063	0,177
Alter 10 Monate Eiweißzufuhr 1,9 g/kg/Tag Lysinzufuhr ca.140 mg/kg/Tag	0,079	0,194
Alter 13 Monate Eiweißzufuhr 1,3 g/kg/Tag Lysinzufuhr ca. 80 mg/Tag	0,050	0,062
Normale Kinder		
4 - 30 Monate alt (Ghadimi u. Pecora, 1964)	-	0,227 $\pm$ 0,091
6 - 18 Jahre alt (Armstrong u. Stave, 1973	-	0,170 $\pm$ 0,028

Tabelle 6 : 2-Aminoadipinsäure- und Lysinausscheidung im Urin unter verschiedener Lysinzufuhr mit der Nahrung.

	2-Aminoadipinsäure		Lysin	
	/uMol/Min/1,73m^2	/uMol/24Std.	/uMol/Min/1,73m^2	/uMol/24Std.
Patient S.G.				
Alter 1,5 Monate Eiweißzufuhr 4,5 g/kg/Tag Lysinzufuhr 390 mg/kg/Tag	3,153	519,7	0,736	121,3
Alter 5,5 Monate Eiweißzufuhr 2,0 g/kg/Tag* Lysinzufuhr 170 mg/kg/Tag	0,601	155,1	0,205	52,9
Alter 6 Monate Eiweißzufuhr 2,0 g/kg/Tag** Lysinzufuhr ø	0,189	48,8	0,056	14,5
Kontrollen:				
5,5 Monate alt	0,082	20,9	0,133	33,9
9 Monate alt	0,088	28,5		
16 Monate alt	0,058	20,9	0,144	51,6
Literaturangaben:				
Stein (1953), Erwachsene		62		
Freeman u.Mitarb.(1970) 3 - 7 Monate alt		Spur - 8,1		3 - 146
Brodehl u.Gellissen(1968) 0,5 - 4 Monate alt			0,171	
Scriver u. Davies (1965) 3 - 10 Jahre alt			0,113	51,6

* nach 5 Tagen eines lysinfreien Aminosäurengemisches unter Zugabe von 170 mg/kg/Tag von Lysin

** nach 5 Tagen eines lysinfreien Aminosäurengemisches ohne Zugabe von Lysin.

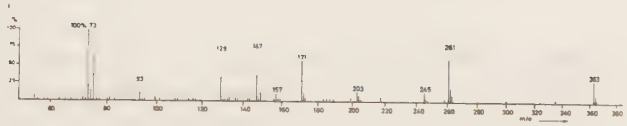


Abbildung 22 : Massenspektrum des tri-TMS-Derivates von 2-Hydroxyadipinsäure aus dem Urin von S.G.

Parent peak M = 378 (gerade sichtbar, aber nicht dargestellt); M-CH_3 = 363; 335 = nicht erklärt; M-COOTMS = 261; 335-TMSOH = 245; 261-TMSOH = 171.

Bei einem weiteren unbekannten Peak mit RRT 0,988 im Gaschromatogramm (das entspricht der RRT von Adipinsäure) dürfte es sich wahrscheinlich um 4-Hydroxycyclohexan-1-carbonsäure handeln, da sein Massenspektrum mit dem von Bindel u. Mitarb. (1976) für die Substanz beschriebenen identisch ist.

Darüberhinaus waren die folgenden Säuren vermehrt im Urin nachweisbar:

3-Hydroxybuttersäure (RRT 0,450) 1,018 mMol/l bzw. 0,939 mMol/g Kreatinin;

Glutarsäure (RRT 0,836) 0,492 mMol/l bzw. 0,453 mMol/g Kreatinin;

2-Hydroxyglutarsäure (RRT 1,087);

2-Oxoglutarsäure (RRT 1,128) 2,361 mMol/l bzw.
2,177 mMol/g Kreatinin;
Aconitinsäure (RRT 1,308) 1,379 mMol/l bzw.
1,269 mMol/g Kreatinin.

Die Identität aller dieser Substanzen wurde massenspektrometrisch bestimmt.

4.2.1.4.5. Belastungstests mit L-Lysin

Die erste orale Lysinbelastung mit 0,68 mMol/kg wurde im Alter von 5,5 Monaten durchgeführt. Vorhergegangen war eine Phase normaler Ernährung.

Die Belastung führte bei der Patientin zu profusen Durchfällen ohne Beeinträchtigung ihres Allgemeinzustandes und zum Auftreten einer kompensierten metabolischen Azidose über die folgenden 24 Std. mit Basendefiziten bis zu -9 mÄq/l.

Den raschen Anstieg des Plasmalysinspiegels, mit einem Maximum bei 180 Minuten nach Gabe und der Lysinausscheidung im Urin zeigt Abbildung 23 .

Die Plasmaspiegel waren nach 28 Stunden noch nicht zum Ausgangswert zurückgekehrt.

Ein gleichaltriges Kontrollkind, das dieselbe Lysindosis auf das Körpergewicht bezogen erhielt, zeigte einen geringen Anstieg der Lysinausscheidung. Blutspiegelbestimmungen bei der Kontrolle wurden nicht für gerechtfertigt erachtet.

Die Veränderungen des Plasmaspiegels und der Urinausscheidung von 2-Aminoadipinsäure nach der Lysingabe von Patientin und Kontrolle zeigt Abbildung 24 . Bei der Patientin kommt es zu einem raschen Anstieg des Plasmaspiegels, mit einem Maximum bei 180 Minuten, und einem zweiten Wiederanstieg nach 28 Stunden, der möglicherweise in Relation zu setzen ist zur Nahrungsaufnahme, die 4 Stunden nach Gabe der Testdosis in üblicher Weise wieder begonnen

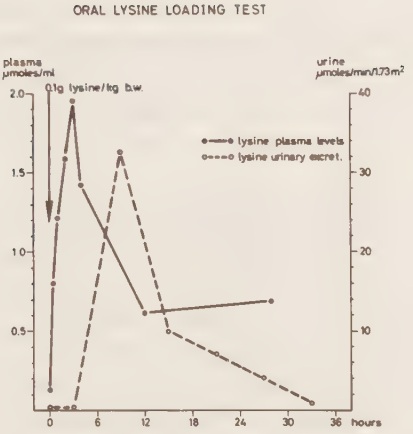


Abbildung 23 :
Orale Lysinbelastung. Lysinspiegel im Plasma und Lysinausscheidung im Urin. Die Lysinausscheidung des Kontrollkindes läßt sich in dem gewählten Maßstab nicht wiedergeben.

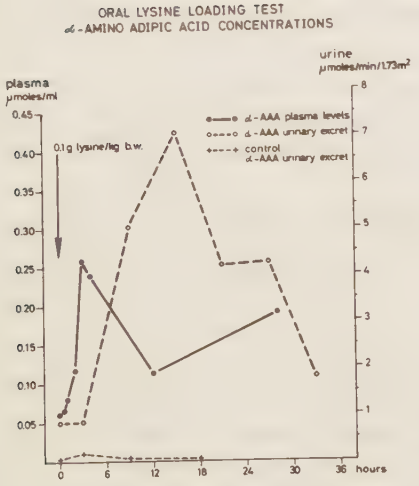


Abbildung 24: Orale Lysinbelastung. Plasmaspiegel und Urinausscheidung von 2-Aminoadipinsäure nach oraler Lysingabe bei Patientin S.G. und Kontrolle.

wurde. Auch die 2-Aminoadipinsäureausscheidung steigt etwas verzögert gegenüber der Lysinausscheidung deutlich an und erreicht erst 72 Stunden später ihren Ausgangswert. Das Kontrollkind dagegen zeigt vorübergehend einen geringen Anstieg der 2-Aminoadipinsäureausscheidung.

Nach der Lysingabe kam es bei der Patientin zu einer mäßig vermehrten Ausscheidung von Glycin und Cystin im Urin, nicht jedoch bei der Kontrolle.

In der folgenden Tabelle sind die Veränderungen der 2-Oxoadipinsäure-, 2-Hydroxyadipinsäure- und Glutarsäureausscheidung nach der Lysingabe bei der Patientin und der Kontrolle angegeben. Es findet sich bei der Patientin ein Anstieg in der Ausscheidung aller drei Substanzen, der der von Lysin und 2-Aminoadipinsäure parallel verläuft. Die Glutarsäure dürfte vermutlich durch Dekarboxylierung von 2-Oxoadipinsäure spontan entstanden sein.

Tabelle 7 : Orale Lysinbelastung. Ausscheidung von 2-Oxoadipinsäure, 2-Hydroxyadipinsäure und Glutarsäure vor und nach der Gabe von Lysin (mMol/g Kreatinin).

	-6 - 0 Std.	0 - 6 Std.	6 - 12 Std.	12 - 18 Std. nach Gabe
2-Oxoadipinsäure				
Patientin S.G.	0,784	2,625	9,696	8,639
Kontrolle	1,773	0,519	0,353	0,548
2-Hydroxyadipinsäure				
Patientin S.G.	2,198	2,468	6,324	6,344
Kontrolle	-	-	-	-
Glutarsäure				
Patientin S.G.	0,302	0,439	0,757	0,356
Kontrolle	-	-	-	-

Der relativ hohe Ausgangswert für 2-Oxoadipinsäure bei der Kontrolle kann nicht erklärt werden, die übrigen Meßwerte liegen im untersten Meßbereich und sind sehr ungenau. Glutarsäure und 2-Hydroxyadipinsäure waren im Urin der Kontrolle nicht nachweisbar.

Die zweite orale Lysinbelastung mit 0,55 mMol/kg wurde im Alter von 40 Monaten durchgeführt. Es kam zu keinerlei klinischen Symptomen, ebenso nicht zum Auftreten einer metabolischen Azidose.

Die Aminosäurenkonzentrationen bzw. -ausscheidung nach Lysin sind in der folgenden Tabelle 8 aufgeführt. Auch jetzt kommt es im Plasma zu einem Anstieg von Lysin, mit einem Maximum nach 120 Minuten, und 2-Aminoadipinsäure, mit einem Maximum zwischen 180 und 240 Minuten, der aber deutlich weniger ausgeprägt ist als bei der früheren Belastung, insbesondere ist der Ausgangswert des Lysins nach 16 Stunden wieder erreicht. Die vermehrte Lysinausscheidung ist nur in den ersten 6 Stunden auffällig.

Bei den übrigen Aminosäuren ist auffallend eine niedrige Konzentration der verzweigtkettigen Aminosäuren, von Methionin, Tyrosin und Phenylalanin bei relativ hohen Alaninspiegeln im Plasma, wie sie im Hungerzustand gesehen wird. Die Patientin erhielt zu der Zeit und während der folgenden Belastungstests 1,2 g Eiweiß/kg/Tag in der Nahrung.

Die Glycinausscheidung lag im Normbereich.

Pipecolinsäure ließ sich durch kolorimetrische Bestimmung im Serum nicht nachweisen. Auch bei Vereinigung aller Proben der Lysin- und Hydroxylysinbelastung, Enteiweißung mit gleichem Volumen 0,6 N Trichloressigsäure und Fraktionierung des Überstandes über eine 25 x 2 cm Dowex 50W X2 (100 - 200 mesh, H^+)-Säule und anschließende Fraktionierung der Fraktion 250 - 370 ml über eine zweite Dowex 50W X2-Säule (1 x 30 cm, H^+) ließ sich in dünnschichtchromatografischer zweidimensionaler Trennung der einzelnen eingeengten Fraktionen keine Pipecolinsäure nachweisen.

Tabelle 8 : Lysinbelastung im Alter von 40 Monaten (0,55 mMol/kg)

	PLASMA [uMol/ml]						
	0'	60'	120'	180'	240'	360'	16 Std.
Taurin	0,032	0,026	0,028	0,030	0,026	0,028	0,015
Hydroxyprolin	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.
Asparaginsäure	0,020	0,016	0,018	0,017	0,017	0,011	z.w.
Threonin	0,071	0,059	0,062	0,061	0,056	0,056	0,039
Serin	0,154	n.g.	n.g.	0,138	n.g.	n.g.	n.g.
Glutamin*	0,329	0,426	0,358	0,342	0,270	0,356	0,402
Prolin	0,244	0,305	0,345	0,330	0,388	0,350	n.g.
Glutaminsäure	0,370	0,326	0,348	0,362	0,367	0,249	0,325
Citrullin	z.w.	0,008	0,020	0,022	0,019	0,017	n.g.
Glycin	0,182	0,154	0,165	0,161	0,159	0,167	0,137
Alanin	0,477	0,426	0,490	0,493	0,497	0,315	0,152
2-Aminoadipinsäure	z.w.	0,011	0,041	0,071	0,075	0,063	0,036
2-Aminobuttersäure	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.
Valin	0,107	0,077	0,096	0,092	0,087	0,097	0,077
Halbcystin	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	0,044	z.w.	z.w.
Methionin	0,010	0,008	0,009	0,009	0,009	0,009	0,011
Isoleucin	0,029	0,017	0,021	0,018	0,014	0,024	0,021
Leucin	0,040	0,023	0,032	0,031	0,028	0,045	0,034
Tyrosin	0,028	0,017	0,022	0,022	0,019	0,023	0,014
Phenylalanin	0,031	0,018	0,024	0,026	0,023	0,032	0,025
Ornithin	0,029	0,022	0,032	0,025	0,024	0,032	0,036
Äthanolamin	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.
Lysin	0,095	0,553	0,693	0,490	0,310	0,221	0,114
1-Methylhistidin	-	-	-	-	-	-	-
Histidin	0,061	0,057	0,064	0,062	0,062	0,062	0,046
3-Methylhistidin	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Arginin	0,038	0,035	0,055	0,046	0,058	0,041	0,031

z.w. = zu wenig
z.v. = zu hoher Peak
z.f. = Peak zu flach zum Auswerten

n.g. = nicht getrennt
n.b. = nicht bestimmt
- = kein Peak

URIN

0 - 6 Std. (55 ml)		6 - 14 Std. (6 ml)		14 - 20 Std. (11 ml)	
uMol/ml	uMol/6 Std.	uMol/ml	uMol/8 Std.	uMol/ml	uMol/6 Std.
0,035	1,913	0,094	0,563	0,121	1,327
z.w.		z.w.		n.g.	
0,022	1,210	n.g.		0,267	2,937
0,175	9,650	0,282	1,690	n.g.	
0,617	33,930	1,116	6,700	0,312	3,432
1,677	92,240	3,255	19,530	1,450	15,950
z.w.		z.w.		n.g.	
0,072	3,980	0,160	0,960	2,656	29,216
-		z.w.		n.g.	
3,502	192,600	6,054	36,330	8,779	96,569
1,189	65,400	1,224	7,340	1,290	14,190
1,998	109,900	8,052	48,310	7,923	87,153
z.w.		z.w.		z.w.	
0,040	2,190	0,091	0,540	0,058	0,638
z.w.		z.w.		z.w.	
***					
0,063	3,480	***		***	
0,052	2,850				
0,079	4,350	0,176	1,060	0,186	2,046
0,068	3,720	0,196	1,170	0,162	1,782
0,137	7,550	0,325	1,950	z.w.	
0,204	11,240	0,551	3,310	0,392	4,312
2,302	126,620	1,082	6,490	0,870	9,570
0,076	4,170	n.g.		n.g.	
1,533	84,341	3,146	18,880	1,493	16,423
0,134	7,350	0,393	2,360	0,283	3,113
n.b.		n.b.		n.b.	
z.w.		0,083	0,496	z.w.	

* = enthält Glutamin und Asparagin, als Glutamin berechnet

*** = mehrere nicht identifizierte Peaks

4.2.1.4.6. Hydroxylysin

Die orale Belastung mit 0,87 mMol/kg allo-5-Hydroxy-D,L-lysin wurde im Alter von 41 Monaten durchgeführt unter Einstellung auf eiweißarme Kost (1,2 g Eiweiß/kg/Tag). Die Plasmaspiegel der Aminosäuren unter Belastung und die Urinausscheidung sind in Tabelle 9 aufgeführt. Hydroxylysin und allo-Hydroxylysin steigen beide im Plasma rasch an, erreichen ihr Maximum bei 180 Minuten und sind nach 6 Stunden auf den 60 Minuten-Wert abgefallen. Ein echter Anstieg des 2-Aminoadipinsäurespiegels im Plasma ist nicht nachweisbar. Die Glycin- und Alaninspiegel sind normal, der Leucinspiegel durchweg erniedrigt. Pipecolinsäure im Serum ist nicht nachweisbar (siehe Lysinbelastung).

Im Urin erscheinen Hydroxylysin und allo-Hydroxylysin vorwiegend in den ersten 6 Stunden (56,13 µMol/Std. bzw. 37,58 µMol/Std.); insgesamt werden in den 18 Stunden der Sammelperiode 1123,9 µMol Hydroxylysin + allo-Hydroxylysin ausgeschieden. Die Gesamtdosis oral betrug 11,2 mMol.

Die 2-Aminoadipinsäureausscheidung betrug in den ersten 6 Stunden 14,5 µMol, in den zweiten 6 Stunden 21,1 µMol, und in der dritten Periode 23,3 µMol, Werte die nicht über der gewöhnlich beobachteten Ausscheidung lagen.

4.2.1.4.7. Tryptophan

Orale Gabe von 0,88 mMol/kg L-Tryptophan im Alter von 40 Monaten ebenfalls unter eiweißarmer Kost führte wiederum zu keinen klinischen Symptomen und verursachte die in Tabelle 10 aufgeführten Veränderungen der Plasma und Urinaminosäuren.

Der Plasmatryptophanspiegel erreichte sein Maximum zwischen 120 und 180 Minuten nach Gabe und hatte seinen Ausgangswert nach 6 Stunden noch nicht wieder erreicht. Die Beurteilung des Einflusses von Tryptophan auf den 2-Aminoadipinsäurespiegel ist praktisch nicht möglich aufgrund von methodischen Schwierigkeiten, allerdings liegen die meßbaren Spiegel höher als nach Hydroxylysin.

Tabelle 9: Hydroxylysinbelastung im Alter von 41 Monaten (0,87 mMol/kg)

	PLASMA µMol/ml					
	0'	60'	120'	180'	240'	360'
Taurin	0,013	0,013	0,011	0,012	0,017	0,014
Hydroxyprolin	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.
Asparaginsäure	0,008	0,009	0,012	0,011	0,008	0,014
Threonin	0,085	0,118	0,086	0,083	0,090	0,092
Serin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Glutamin*	0,586	0,477	0,459	0,507	0,471	0,443
Prolin	0,204	0,221	0,177	0,227	0,211	n.g.
Glutaminsäure	0,302	0,324	0,293	0,277	0,324	0,323
Citrullin	0,032	0,027	0,028	0,030	0,028	0,025
Glycin	0,197	0,179	0,154	0,155	0,174	0,180
Alanin	0,240	0,242	0,194	0,181	0,205	0,200
2-Aminoadipinsäure	z.w.	0,006	0,008	z.w.	0,010	0,020
2-Amino-n-buttersäure	z.w.	0,008	0,008	z.w.	0,009	0,011
Valin	0,115	0,108	0,096	0,093	0,108	0,117
Halb-Cystin	z.f.	z.f.	z.f.	z.f.	z.f.	0,039
Methionin	0,015	0,015	0,012	0,013	0,017	0,017
Isoleucin	0,039	0,036	0,029	0,040	0,039	0,044
Leucin	0,036	0,041	0,033	0,038	0,045	0,052
Tyrosin	0,036	0,036	0,026	0,029	0,033	0,033
Phenylalanin	0,030	0,032	0,025	0,028	0,032	0,029
Hydroxylysin	-	0,137	0,170	0,240	0,203	0,129
Allo-Hydroxylysin	-	0,239	0,305	0,430	0,390	0,249
Ornithin	0,053	0,048	0,043	0,055	0,055	0,044
Äthanolamin	z.w.	0,011	z.w.	0,025	0,015	0,013
Lysin	0,103	0,113	0,090	0,118	0,127	0,100
1-Methylhistidin	-	-	-	-	-	-
Histidin	0,054	0,059	0,041	0,050	0,054	0,049
3-Methylhistidin	-	-	-	-	-	-
Tryptophan	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Arginin	0,058	0,090	0,070	0,093	0,095	0,075

z.w. = zu wenig
z.v. = zu hoher Peak
z.f. = Peak zu flach zum Auswerten

n.g. = nicht ausreichend getrennt
n.b. = nicht bestimmt
- = kein Peak

URIN

0 - 6 Std. (16 ml)		6 - 12 Std. (14 ml)		12 - 18 Std. (20 ml)	
uMol/ml	uMol/6 Std.	uMol/ml	uMol/6 Std.	uMol/ml	uMol/6 Std.
0,036	0,572	z.w.		0,019	0,381
z.w.		z.w.		z.w.	
n.g.**		z.w.**		z.w.**	
0,329	5,259	0,355	4,965	0,264	5,273
0,982	15,720	n.g.		n.g.	
1,779	28,464	n.g.		1,665	33,305
z.w.		z.w.		z.w.	
0,125	2,001	0,065	0,914	0,054	1,074
z.w.		z.w.***		z.w.***	
z.v.		z.v.		3,464	69,272
0,540	8,634	0,657	9,199	0,521	10,426
0,906	14,501	1,506	21,088	1,167	23,347
0,015	0,240	0,031	0,440	z.w.	
0,049	0,791	0,088	1,225	0,072	1,444
0,122	1,960	0,166	2,320	z.w.	
****					
0,121	1,935	0,123	1,727	0,099	1,985
0,098	1,570	0,104	1,459	0,088	1,756
21,050	336,793	10,242	143,384	9,482	189,647
14,096	225,537	7,251	101,511	6,353	127,055
0,107	1,712	0,149	2,086	0,199	3,976
0,371	5,943	0,730	10,218	n.g.	
0,666	10,662	0,604	8,451	0,479	9,581
0,109	1,750	0,103	1,441	0,046	0,919
1,333	21,331	1,756	24,579	1,460	29,200
0,195	3,117	0,283	3,962	0,218	4,360
n.b.		n.b.		n.b.	
0,118	1,897	0,107	1,491	0,083	1,653

* = enthält Glutamin und Asparagin, als Glutamin berechnet
** = überlagert von hohem Peak, der zwischen 6 und 12 Std. nach Gabe am höchsten ist
*** = unbekannter Peak zwischen Citrullin und Glycin
**** = Gegend unzureichend getrennt, viele nicht identifizierte Peaks.

Tabelle 10: Tryptophanbelastung im Alter von 40 Monaten (0,88 mMol/kg)

	PLASMA /uMol/ml					
	0'	60'	120'	180'	240'	360'
Taurin	0,023	0,015	0,013	v.	0,013	0.011
Hydroxyprolin	z.w.	z.w.	z.w.		z.w.	z.w.
Asparaginsäure	0,010	z.w.	0,010		0,011	0,011
Threonin	0,090	0,071	0,077		0,075	0,067
Serin	n.g.	n.g.	n.g.		n.g.	n.g.
Glutamin*	0,499	0,463	0,529		0,534	0,589
Prolin	0,334	n.g.	n.g.		n.g.	0,201
Glutaminsäure	0,348	0,345	0,410		0,383	0,400
Citrullin	n.g.	n.g.	n.g.		z.w.	0,032
Glycin	0,222	0,176	0,188		0,185	0,200
Alanin	0,476	0,312	0,310		0,281	0,257
2-Aminoadipinsäure	z.w.	z.w.	z.w.		0,033	0,041
2-Aminobuttersäure	z.w.	z.w.	z.w.		z.w.	z.w.
Valin	0,069	0,130	0,138		0,129	0,113
Halbcystin	z.w.	z.w.	z.w.		z.w.	z.w.
Methionin	0,018	0,018	0,018		0,018	0,016
Isoleucin	0,051	0,037	0,037		0,036	0,032
Leucin	0,052	0,038	0,042		0,044	0,042
Tyrosin	0,039	0,031	0,035		0,033	0,021
Phenylalanin	0,039	0,033	0,033		0,033	0,029
Ornithin	0,070	0,048	0,051	0,041	0,031	0,033
Äthanolamin	z.w.	z.w.	0,029	z.w.	z.w.	z.w.
Lysin	0,084	0,071	0,076	0,053	0,055	0,068
1-Methylhistidin	-	-	-	-		-
Histidin	0,049	0,041	0,057	0,032	v.	0,027
3-Methylhistidin	-	-	-	-		-
Tryptophan**	0,032	0,255	0,398	0,401	0,319	0,186
Arginin	0,070	0,049	0,085	v.	v.	0,041

z.w. = zu wenig
n.g. = nicht getrennt
n.b. = nicht bestimmt
v. = verunglückt

URIN

0 - 6 Std. (16 ml)		6 - 12 Std. (28 ml)		12 - 18 Std. (14 ml)	
uMol/ml	uMol/6 Std.	uMol/ml	uMol/6 Std.	uMol/ml	uMol/6 Std.
0,175	2,794	0,123	3,450	0,035	0,483
0,416	6,660	z.w.		z.w.	
n.g.		0,130	3,628	n.g.	
0,719	11,504	0,342	9,567	0,314	4,391
1,098	17,574	1,560	43,692	1,096	15,342
2,779	44,462	3,327	93,158	2,513	35,184
n.g.***		z.w.		n.g.	
n.g.		0,309	8,665	n.g.	
0,029	0,462	0,212	5,933	z.w.	
10,540	168,646	9,730	272,449	9,020	126,286
2,718	34,840	1,829	51,218	1,733	24,260
2,483	39,724	4,114	115,203	3,608	50,516
z.w.		z.w.		z.w.	
0,174	2,787	0,108	3,031	0,061	0,859
z.w.***		***		***	
***		***		***	
0,359	5,750	0,150	4,186	0,132	1,853
0,260	4,164	0,167	4,683	0,140	1,957
0,071	1,140	0,069	1,944	0,063	0,892
0,168	2,695	0,462	12,941	0,841	11,776
0,468	7,491	n.g.		n.g.	
n.g.		0,405	11,338	0,228	3,189
1,033	16,521	1,471	41,179	1,589	22,242
0,235	3,765	0,348	9,755	0,244	3,422
n.b.		n.b.		n.b.	
0,342	5,466	0,178	5,015	0,069	0,971

* = Peak enthält Glutamin und Asparagin, berechnet als Glutamin

** = bestimmt in modifiziertem Verfahren, siehe Methoden

*** = unbekannte Peaks

Die Lysin- und Leucinspiegel sind durchweg auffallend niedrig.

Im Urin ist Tryptophan mit der beschriebenen Methode nicht sicher von anderen Substanzen abtrennbar, weshalb auf Angabe von Werten verzichtet wird.

Die 2-Aminoadipinsäureausscheidung nimmt nach Tryptophan aber deutlich zu, ist in der zweiten 6-Stunden-Periode am höchsten und vergleichbar mit der nach Lysingabe.

Ebenso nimmt die Ausscheidung von 2-Hydroxyadipinsäure und Glutarsäure zu, letztere wiederum vielleicht als Folge spontaner oder bakteriell bedingter Dekarboxylierung von 2-Oxoadipinsäure, die in auffallend geringer Konzentration gefunden wurde (Tabelle 11).

Tabelle 11 : Ausscheidung organischer Säuren im Urin nach Tryptophanbelastung (0,88 mMol/kg).

	0 - 6 Std. / uMol/6 Std.	6 - 12 Std. / uMol/6 Std.	12 - 18 Std. / uMol/6 Std.
2-Hydroxyadipinsäure	5,2	23,5	6,7
2-Oxoadipinsäure	ø	4,2	ø
Glutarsäure	23,6	134,4	56,6
Adipinsäure + 4-Hydroxy-cyclohexan-1-carbonsäure*	3,4	8,2	2,4
Bernsteinsäure	13,1	36,7	20,9
Milchsäure	5,4	20,4	8,1

* überwiegend 4-Hydroxycyclohexan-1-carbonsäure, für die keine Kalibrierungskurve erstellt werden konnte, darum handelt es sich um Näherungswerte.

Eine Fehlermöglichkeit bei den drei bisher beschriebenen Belastungen ist das kleine Volumen der ausgeschiedenen Urinmengen pro Sammelperiode. Da spontan gelassener Urin gesammelt wurde, war eine vollständige Blasenentleerung nicht gewährleistet.

4.2.1.4.8. Pipecolinsäurebelastung

Während der Sammelperioden nach oraler Gabe von 0,44 mMol/kg D,L-Pipecolinsäure, wurde Urin über einen Blasenkatheter gesammelt. Die geringen Volumina, die hierbei gewonnen wurden, lassen die spontan gewonnenen Volumina unter den anderen Belastungen wiederum als möglich erscheinen.

Der Basiswert von Pipecolinsäure im Plasma ist nicht bestimmbar mit unserer Methodik, wie auch aus dem Versuch der Bestimmung in den vereinigten Restplasmen der Lysin- und Hydroxylysinbelastungen hervorgeht.

Der Pipecolinsäurespiegel im Plasma steigt rasch an, erreicht sein Maximum bei 120 Minuten und ist nach 6 Stunden noch stark erhöht. Eine kolorimetrische Bestimmung der Pipecolinsäure im Urin wurde nicht versucht.

Die Seren der Pipecolinsäurebelastung wurden in der angegebenen Weise vereinigt, enteiweißt und zweimal fraktioniert. Nach der ersten Fraktionierung fand sich die Farbreaktion mit Ninhydrin in Eisessig, gemessen bei 560 nm in den Fraktionen 290 bis 380 ml. Nach der zweiten Fraktionierung dieser vereinigten und eingeengten Fraktionen und zweidimensionaler dünnschichtchromatografischer Trennung der eingeengten Einzelfraktionen zeigte die Fraktion 160 ml Pipecolinsäure, Valin, Spuren von Prolin und 2-Aminoadipinsäure, die Fraktion 170 ml sehr viel Pipecolinsäure, weniger Valin, Spuren von Prolin, Isoleucin und Leucin, die Fraktion 180 ml etwas weniger Pipecolinsäure, Isoleucin, Leucin und die Fraktion 200 ml nur noch Isoleucin und Leucin.

Die Fraktionen 170 und 180 ml wurden strichförmig auf präparativ-Kieselgelplatten getrennt, die entsprechende Bande nach Anfärbung der Ränder mit Ninhydrin ausgekratzt, in Wasser aufgenommen und nach Zentrifugieren eingeengt.

Eindimensionale Dünnschichtchromatografie dieser Lösung im Vergleich zu authentischer Pipecolinsäure ergab vergleichbare R_f-Werte: 0,46 und 0,44 im System Pyridin/Dioxan/Ammoniak/H_2O (17,5/

17,5/7,5/7,5; V/V) bzw. 0,45 und 0,46 im System n-Butanol/Azeton/Eisessig/H_2O (17,5/17,5/5/10; V/V).

Nach Reaktion eines Aliquots mit 0,15 % Ninhydrin in Eisessig ergab sich ein mit authentischer Pipecolinsäure identisches Spektrum (Abbildung 25).

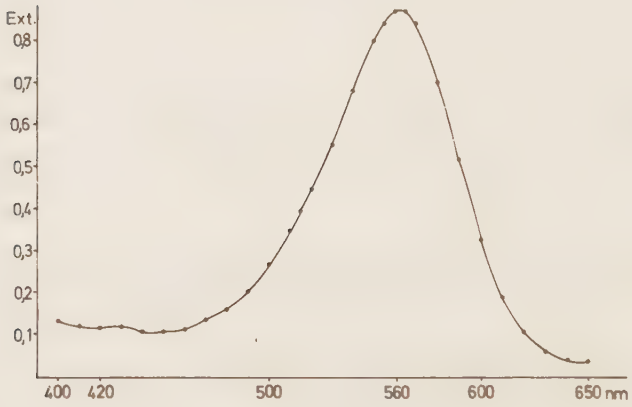


Abbildung 25 : Spektrum der aus Plasma der Patientin S.G. isolierten Substanz nach Reaktion mit Ninhydrin (0,15 %) in Eisessig.

Die Spiegel der 2-Aminoadipinsäure im Plasma nach Gabe von Pipecolinsäure steigen an; ob es sich dabei um einen echten Anstieg handelt, bleibt fraglich. Auffallend sind wiederum die hohen Alaninspiegel und die niedrigen Spiegel von Isoleucin, Leucin, Tyrosin und Phenylalanin.

Tabelle 12: Pipecolinsäurebelastung im Alter von 41 Monaten (0,44 mMol/kg)

	PLASMA uMol/ml					
	0'	60'	120'	180'	240'	360'
Taurin	0,019	0,015	0,016	0,015	0,015	0,026
Hydroxyprolin	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.
Asparaginsäure	0,018	0,013	0,016	0,014	0,011	0,012
Threonin	0,081	0,084	0,100	0,078	0,087	0,075
Serin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Glutamin*	0,453	0,487	0,546	0,480	0,492	0,444
Prolin	0,251	0,320	0,760	0,595	0,507	n.g.
Glutaminsäure	0,295	0,323	0,303	0,276	0,259	0,303
Citrullin	0,019	0,028	0,025	0,026	0,024	0,030
Glycin	0,276	0,304	0,313	0,252	0,230	0,238
Alanin	0,668	0,626	0,807	0,668	0,507	0,337
2-Aminoadipinsäure	0,007	0,008	0,013	0,029	0,027	0,024
2-Aminobuttersäure	z.w.	z.w.	0,005	0,005	z.w.	z.w.
Valin	0,110	0,107	0,113	0,102	0,100	0,090
Halb-Cystin**	0,090	0,079	0,103	z.f.	z.f.	0,051
Pipecolinsäure***	z.w.	0,483	0,881	0,586	0,484	0,283
Methionin	0,010	0,011	0,012	0,015	0,013	0,014
Isoleucin	0,024	0,027	0,031	0,031	0,025	0,025
Leucin	0,041	0,041	0,058	0,056	0,042	0,035
Tyrosin	0,023	0,025	0,029	0,025	0,026	0,025
Phenylalanin	0,020	0,025	0,027	0,024	0,028	0,027
Ornithin	v.	0,040	0,041	0,046	0,052	0,027
Äthanolamin	v.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.	z.w.
Lysin	v.	0,088	0,082	0,080	0,080	0,035
1-Methylhistidin	v.	-	-	-	-	-
Histidin	v.	0,076	0,081	0,073	0,077	0,026
3-Methylhistidin	v.	-	-	-	-	-
Arginin	v.	0,078	0,072	0,076	0,075	0,041

z.w. = zu wenig
z.f. = zu flacher Peak zum Auswerten
n.g. = nicht getrennt
n.b. = nicht bestimmt
v. = verunglückt

URIN

0 - 6 Std. (39 ml)		6 - 12 Std. (8 ml)		12 - 18 Std. (46,5 ml)	
uMol/ml	uMol/6 Std.	uMol/ml	uMol/6 Std.	uMol/ml	uMol/6 Std.
0,037	1,454	0,126	1,006	0,071	3,287
0,738	28,784	0,752	6,020	0,415	19,277
0,037	1,429	0,077	0,617	0,028	1,295
0,292	11,386	0,649	5,193	0,306	14,213
n.g.		2,247	17,975	0,855	39,748
2,280	88,932	4,792	38,336	2,262	105,195
0,386	15,067	0,280	2,243	n.g.	
z.w.		0,150	1,197	0,173	8,059
z.w.		0,035	0,277	z.w.	
13,297	518,595	z.v.		11,156	518,756
1,706	66,522	2,139	17,116	1,454	67,589
1,239	48,330	5,092	40,733	3,264	151,777
z.w.		z.w.		z.w.	
0,064	2,497	0,118	0,944	0,052	2,419
n.g.		n.g.		n.g.	
n.b.		n.b.		n.b.	
	****				
0,099	3,859	0,257	2,053	0,153	7,128
0,082	3,191	0,258	2,062	0,126	5,845
0,236	9,187	0,106	0,845	n.g.	
0,447	17,417	1,248	9,986	n.g.	
0,616	24,020	0,641	5,131	0,444	20,649
0,088	3,436	0,219	1,750	0,117	5,449
1,968	76,765	3,644	29,152	1,881	87,467
0,173	6,736	0,545	4,362	0,294	13,665
0,066	2,579	0,129	1,036	0,062	2,895

* = Glutamin und Asparagin, als Glutamin berechnet
** = Cystin und Pipecolinsäure
*** = kolorimetrisch bestimmt
**** = Gegend schlecht getrennt, Peaks nicht sicher zu identifizieren

Im Urin findet sich fraglos ein Anstieg der 2-Aminoadipinsäureausscheidung, allerdings erst in der dritten Sammelperiode (Tabelle 12).

Die Bestimmung der organischen Säuren des Urins nach Gabe von Pipecolinsäure ergab deutliche Anstiege von 2-Hydroxyadipinsäure, 2-Oxoadipinsäure und Glutarsäure, jeweils in der dritten 6-Stunden-Sammelperiode (Tabelle 13).

Tabelle 13 : Urinausscheidung organischer Säuren nach Gabe von Pipecolinsäure (0,44 mMol/kg).

	0 - 6 Std. µMol/6 Std.	6 - 12 Std. µMol/6 Std.	12 - 18 Std. µMol/6 Std.
2-Hydroxyadipinsäure	8,7	7,5	22,4
2-Oxoadipinsäure	ø	15,5	wenig
Glutarsäure	35,1	26,2	118,3
Adipinsäure + 4-Hydroxycyclohexan-1-carbonsäure*	11,1	4,6	10,3
Bernsteinsäure	23,4	8,3	37,8
Milchsäure	17,8	7,0	35,9

* überwiegend 4-Hydroxycyclohexan-1-carbonsäure, für die keine Kalibrierungskurve erstellt werden konnte, daher handelt es sich um Näherungswerte.

4.2.1.4.9. Degradationsuntersuchungen in Fibroblasten

Die Bildung von $^{14}CO_2$ aus markierter [1-^{14}C]-2-D,L-Aminoadipinsäure ($4{,}63 \cdot 10^{-5}$ M im Inkubationsmedium), [1-^{14}C]-2-Oxoadipinsäure ($5{,}23 \cdot 10^{-5}$ M) und [1,5-^{14}C]-Glutarsäure ($5{,}17 \cdot 10^{-4}$M) durch Fibroblasten (40 000 Zellen, entsprechend etwa 20 µg Zellprotein pro Ansatz) der Patientin S.G. wurde mit der durch Fibroblasten von 8 Normalpersonen verglichen (Abbildung 26). Die Fibroblasten der Patientin bildeten mit [1-^{14}C]-2-D,L-Aminoadipinsäure nur 14 % des Mittelwertes von von 8 Kontrollen gebildetem $^{14}CO_2$, mit [1-^{14}C]-2-Oxoadipinsäure 7 %, dagegen wurde [1,5-^{14}C]-Glutarsäure im gleichen Ausmaß wie bei Normalkontrollen verstoffwechselt. Die Aktivität der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase wurde in Fibroblastenhomogenaten unserer Patientin von Goodman u. Mitarb. normal gefunden.

4.2.1.5. Untersuchungen an Familienangehörigen

Die Mutter C.G. der Patientin war nicht bereit zu einer Blutentnahme. In 24 Stunden schied sie 77 µMol 2-Aminoadipinsäure im Urin aus, 2-Oxoadipinsäure und 2-Hydroxyadipinsäure waren nicht nachweisbar.

Die Mutter von C.G., also die Großmutter der Patientin, wies keine 2-Aminoadipinsäure im Plasma auf. Lysin war mit 0,168 µMol/ml normal.

Untersuchungsmaterial von anderen Familienangehörigen konnte nicht gewonnen werden.

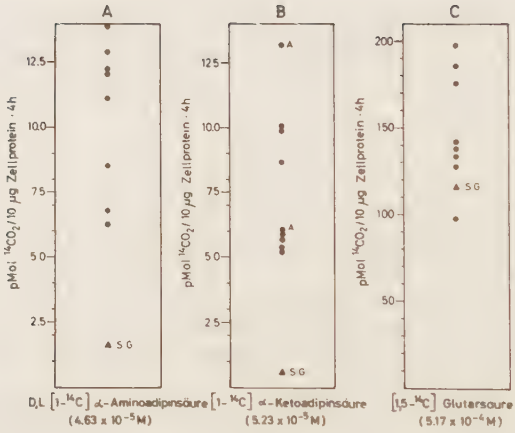


Abbildung 26 : Bildung von $^{14}CO_2$ aus 2-Aminoadipinsäure (A), 2-Oxoadipinsäure (B) und Glutarsäure (C) durch Fibroblasten von Normalpersonen (·) und der Patientin S.G. (▲) (ausgedrückt in pMol $^{14}CO_2$ pro 10/ug Zellprotein pro 4 Stunden). 2-Oxoadipinsäure wird auch von normalen Amnionzellen (A) verstoffwechselt.

4.2.1.6. DISKUSSION

Die 2-Aminoadipinsäureausscheidung der Patientin S.G. übertraf mit Werten um 500 uMol/24 Std. die bei Patienten mit Saccharopinurie (Carson, 1969) und wahrscheinlich auch mit Hyperlysinämie beschriebenen. Sie ist vergleichbar mit den Fällen von 2-Aminoadipaturie und Glutaraziduric, auch was die Höhe der 2-Aminoadipinsäurespiegel im Plasma anbelangt.

2-Oxoadipinsäure war dagegen vorher nicht im Urin des Menschen beschrieben worden. Im Falle der ersten Patientin mit persistierender Hyperlysinämie war von Woody (1964) danach im Urin gesucht worden.

4.2.1.6.1. Der Enzymdefekt der Alphaketoadipaturie

Die Entstehung von 2-Aminoadipinsäure, 2-Oxoadipinsäure und Glutarsäure im Abbau von Lysin wurde erstmals von Borsook u. Mitarb. (1948 a, b u. c) bei Inkubation von Meerschweinchenleber-Homogenat mit [6-^{14}C]-D,L-Lysin erkannt. Der Abbau von L-Hydroxylysin führt nach Untersuchungen von Hiles u. Mitarb. (1970) an Rattenleberextrakten ebenfalls zu 2-Aminoadipinsäure. Auf der Stufe der 2-Oxoadipinsäure mündet darüberhinaus der Stoffwechsel des Tryptophanbenzolringes in denselben Abbauweg ein (Nishizuka u. Mitarb., 1965 - Nishizuka u. Mitarb., 1970) (Abbildung 27). 2-Oxoadipinsäure wird oxidativ mit den Kofaktoren Coenzym A, NAD, Thiaminpyrophosphat, Liponsäure, FAD dekarboxyliert zu Glutaryl-CoA. Diese Reaktion wird möglicherweise durch die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase katalysiert (Hirashima u. Mitarb., 1967 - Kanzaki u. Mitarb., 1969 - Nishizuka u. Mitarb., 1970), eine Isolierung und Charakterisierung einer separaten 2-Oxoadipinsäure-Dehydrogenase ist noch nicht erfolgt. An fraktionierten Organhomogenaten der Ratte wurde bisher nur die subzelluläre Lokalisation und Organverteilung der 2-Oxoadipinsäuredekarboxylierung untersucht. Diese fand sich vorwiegend mitochondrial und mit höchster Aktivität im Herzmuskel, in abnehmender Reihenfolge in Niere, Gehirn, Leber, Skelettmuskulatur und Dünndarm (Suda u. Mitarb., 1977).

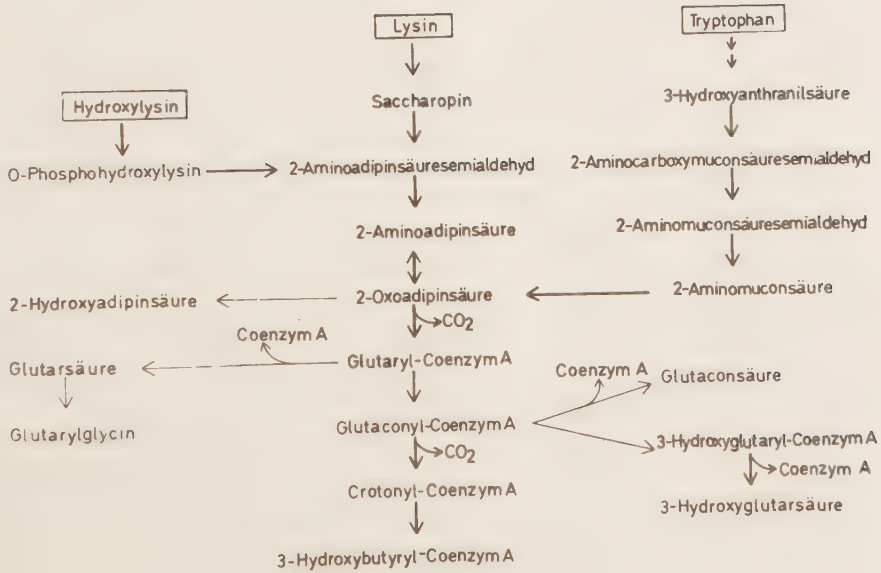


Abbildung 27 : Gemeinsame Abbauschritte im Stoffwechsel von Lysin, Hydroxylysin und dem Benzolring des Tryptophans.

Eine etwaige Kofaktorabhängigkeit des Defektes bei S.G. konnte nicht abgeklärt werden. Relativ kurzdauernde Applikation von Thiamin in Dosen von 200 mg/Tag ergab keine meßbare Änderung in der Ausscheidung von 2-Amino- und 2-Oxoadipinsäure. Casey (1978) berichtete ebenfalls über die Wirkungslosigkeit von Thiamin und Pyridoxin bei seiner Patientin.

Aus den bei S.G. erhobenen Befunden läßt sich die Frage der Identität der 2-Oxoglutarat- und 2-Oxoadipat-Dehydrogenase nicht entscheiden. Zwar sahen wir eine vermehrte Ausscheidung von 2-Oxoglutarsäure von 2,2 mMol/g Kreatinin gegenüber dem von Chalmers u. Mitarb. (1974) angegebenen Normwert bis zu 0,03 mMol/g Kreatinin (erhoben an 400 gesunden Probanden, vorwiegend Erwachsenen). Die ebenfalls vermehrt gefundene 2-Hydroxyglutarsäure könnte durch Reduktion aus der Oxosäure entstanden sein.

Andererseits sollte man bei der bekannten vierfach schnelleren Oxidation von 2-Oxoglutarsäure als von 2-Oxoadipinsäure durch das aus Katzenleber präparierte Enzym (Nishizuka u. Mitarb., 1970) unter der Annahme ähnlicher Verhältnisse beim Menschen bei einem Defekt dieses Enzymes ein Überwiegen der 2-Oxoglutarsäure erwarten können.

Abbaustudien mit ^{14}C-markierter 2-Oxoglutarsäure wurden in den Fibroblasten der Patientin nicht durchgeführt.

Im Reaktionsmechanismus entspricht die Dekarboxylierung von 2-Oxoadipinsäure der von 2-Oxoglutarsäure, Pyruvat und von den verzweigtkettigen 2-Oxosäuren, die aus Leucin, Isoleucin und Valin entstehen. Es ist bekannt, daß diese Oxosäuren sich untereinander in ihrem Stoffwechsel beeinflussen: So wirken 2-Oxoisocapronsäure, 2-Oxo-3-methylvaleriansäure und 2-Oxoisovaleriansäure gegenseitig und ebenso auf die Dekarboxylierung von 2-Oxoglutarsäure und Pyruvat inhibitorisch (Johnson und Connelly, 1972 - Bowden u. Mitarb., 1970 - Kanzaki u. Mitarb., 1969). Kenntnisse über den eventuellen Einfluß von 2-Oxoadipinsäure auf den Abbau anderer Oxosäuren fehlen.

Die Abbaustudien an Fibroblastenkulturen von S.G. zeigten neben einem verminderten Umsatz von 2-Oxoadipinsäure auch eine Verminderung im Umsatz von 2-Aminoadipinsäure. Diese wird, wenn man Untersuchungen an Rattenlebermitochondrien auf den Menschen übertragen kann, reversibel durch eine spezifische Aminotransferase mit 2-Oxoglutarat und dem Coenzym Pyridoxalphosphat zu 2-Oxoadipinsäure oxidativ desaminiert (Nakatani u. Mitarb., 1970). Dieses Enzym ist in Rattenniere wahrscheinlich identisch mit der Kynureninaminotransferase (L-Kynurenin:2-Oxoglutarat Aminotransferase, EC 2.6.1.7) (Tobes und Mason, 1977) und mit der halogenierten Tyrosin-Aminotransferase (Tobes und Mason, 1978). Kynurenin und 2-Aminoadipinsäure sind gegenseitig kompetitiv inhibitorisch. Möglicherweise ist das eine Erklärungsmöglichkeit für den Anstieg von 2-Aminoadipinsäure im Urin unserer Patientin nach Gabe von Tryptophan. Dieselbe Beobachtung hat auch Casey (1978) in seinem fraglichen Fall von 2-Ketoadipaturie gemacht.

2-Oxoadipinsäure wird zu Glutaryl-CoA dekarboxyliert (Nishizuka u. Mitarb., 1965). Fibroblasten unserer Patientin konnten ^{14}C-markiertes Glutarat normal umsetzen, die Aktivität der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase war normal. Wir glauben daher den Block auf der Stufe der 2-Oxoadipinsäure-Dekarboxylierung lokalisiert zu haben.

Wilson u. Mitarb. (1976) konnten in menschlichen Leukozyten die Bildung von 2-Oxoadipinsäure aus ^{14}C-markierter 2-Aminoadipinsäure nachweisen, sowie die $^{14}CO_2$-Freisetzung aus markierter 2-Oxoadipinsäure. Damit steht gut zugängliches Untersuchungsmaterial zur Diagnostik dieser Stoffwechselstörung zur Verfügung.

Wir selbst fanden in normalen Amnionzellkulturen eine Freisetzung von $^{14}CO_2$ aus [1-^{14}C]-2-Oxoadipinsäure, die der von Fibroblasten entsprach (Wendel u. Mitarb., 1975). Damit wäre die theoretische Grundlage einer praenatalen Diagnostik dieser Stoffwechselstörung gegeben. Bei der fraglichen klinischen Bedeutung der Störung wird man sich aber kaum dazu entschließen können.

4.2.1.6.2. Sekundäre Folgen des Enzymdefektes

Der Stoffwechselblock bei S.G. führt zu einem Anstau von 2-Oxoadipinsäure, die offenbar teilweise zu 2-Hydroxyadipinsäure reduziert wird. Eine spezifische NAD-abhängige 2-Oxoadipat-Reduktase mit hoher Substratspezifität wurde von Suda u. Mitarb.(1976) aus menschlicher Plazenta isoliert, damit ergibt sich ein weiterer Abbauweg neben der Dekarboxylierung zu Glutaryl-CoA. Die höchste Aktivität dieses zytoplasmatischen Enzyms wurde bei Ratten im Herzmuskel gefunden, aber ebenso in Dünndarm, Niere, Leber, Gehirn und Skelettmuskulatur. Das Verhältnis der Aktivitäten von 2-Oxoadipatdehydrogenase zu 2-Oxoadipatreduktase verhält sich parallel zum Mitochondriengehalt der Gewebe und ist am höchsten in Niere (1,2) und Herzmuskel (0,8) als relativ aeroben Geweben (Suda u. Mitarb., 1977). Beide Aktivitäten nehmen in Geweben der Ratte vom Ende der Fetalzeit bis zum 56. Lebenstag zu, allerdings unter deutlicher unterschiedlicher Veränderung der Ratio der Aktivitäten zueinander in verschiedenen Organen. In der Leber war die Aktivität der Reduktase bis zum 10. Lebenstag höher als die der Dehydrogenase. Vom 10. bis zum 28. Lebenstag veränderte sich das Verhältnis der Aktivitäten von Dehydrogenase zu Reduktase von 0,08 zu 0,53. Daraus ergibt sich für die Ratte in der Leber ein Überwiegen des reduktiven Abbaus von 2-Oxoadipinsäure für die späte Fetal- und frühe Postnatalzeit (Suda u. Mitarb., 1978). Die verminderte Fähigkeit zur Dekarboxylierung von 2-Oxoadipinsäure bei S.G. führt damit zu Verhältnissen, wie sie möglicherweise in der Fetalperiode physiologisch sind.

4.2.1.6.3. Schlußfolgerungen aus den Belastungstests

Fütterungsversuche mit definierten Lysinmengen an S.G. zeigen die direkte Abhängigkeit der 2-Aminoadipinsäureausscheidung im Urin vorwiegend vom Lysinangebot. Unter lysinfreier Ernährung tritt gleichzeitig ein Absinken des Plasmalysinspiegels unter normale Werte auf bei gleichbleibenden 2-Aminoadipinsäurespiegeln.

Die Belastungsversuche mit Lysin zeigen auch eine direkte Abhängigkeit der 2-Aminoadipinsäurekonzentrationen, die zeitlich verzögert

gegenüber Lysin ansteigen. Dieselbe Abhängigkeit zeigte sich bei Lysinbelastung der beiden Patienten mit 2-Aminoadipaturie von Fischer u. Mitarb. (1974). Parallel dazu verhalten sich bei unserer Patientin 2-Oxoadipinsäure, 2-Hydroxyadipinsäure und Glutarsäure. Zu dem gleichen Ergebnis führte die Lysinbelastung bei dem Patienten von Seakins (1978).

Unterschiede in der Fähigkeit der Patientin, Lysin abzubauen, zeigen sich bei Vergleich der Belastungstests im Alter von 5 1/2 und 40 Monaten. Im Säuglingsalter stiegen die Spiegel von Lysin und 2-Aminoadipinsäure im Plasma deutlich höher an und blieben länger erhöht; während mit 40 Monaten Lysin nach 16 Stunden auf den Nullwert zurückgefallen war, war es im Alter von 5 1/2 Monaten nach 28 Stunden noch deutlich erhöht. Der Kurvenverlauf im Alter von 5 1/2 Monaten ähnelt damit dem von Patienten mit Hyperlysinämie aufgrund eines Lysin:2-Oxoglutarat-Reduktasemangels (Woody, 1964 - van Gelderen und Teijema, 1973) bzw. dem der Patienten von Ghadimi u. Mitarb. (1965). Der Kurvenverlauf im Alter von 40 Monaten entspricht aber noch nicht dem von Kontrollen (Ghadimi u. Mitarb., 1965). Welche adaptiven oder alternativen Stoffwechselwege für diese veränderte Toleranz gegenüber Lysin verantwortlich sind, ist nicht bekannt.

Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch, daß im Gegensatz dazu bei Patienten mit Lysin-2-Oxoglutaratreduktase-Mangel sich die Hyperlysinämie erst jenseits des sechsten Lebensmonats manifestierte (Smith u. Mitarb., 1971).

Obwohl Woody und Pupene (1970) Pipecolinsäure im Urin von Patienten mit Hyperlysinämie nachweisen konnten und obwohl sie nach Injektion von ^{14}C-markiertem L-Lysin im Urin von Normalpersonen und von Hyperlysinämiepatienten ^{14}C-markierte Pipecolinsäure fanden, konnten wir mit unserer Routinedünnschichtchromatografie im Urin von S.G. keine Pipecolinsäure nachweisen. Ebenfalls fand sich in den vereinigten Serumproben (zusammen etwa 20 ml!) nach Lysin- und Hydroxylysinbelastung nach säulenchromatografischer Fraktionierung und Konzentration keine meßbare Pipecolinsäure. Bei dem weit

distal liegenden Enzymblock unserer Patientin ist eine vermehrte Bildung eines Metaboliten in einem Nebenabbauweg allerdings unwahrscheinlich.

Die orale Hydroxylysinbelastung ließ keinen Zusammenhang mit der 2-Aminoadipinsäurekonzentration in Plasma und Blut erkennen. L-Hydroxylysin, das aus dem Kollagenabbau entsteht, wird im Körper zu 10 - 65 % verstoffwechselt (Goodman u. Mitarb., 1972). In Rattenleber wird es über 2-Aminoadipatsemialdehyd zu 2-Aminoadipinsäure abgebaut (Hiles u. Mitarb., 1970)- Die D-Isomere ergeben 5-Hydroxypipecolinsäure (Hammerstedt u. Mitarb., 1968). Da wir zur Belastung allo-D,L-Hydroxylysin verwendeten und eine Trennung von D- und L-Hydroxylysin säulenchromatografisch nicht möglich ist, ist eine Aussage über das Verschwinden von L-Hydroxylysin aus dem Blut nicht möglich.

Orale Tryptophangabe dagegen provozierte bei der Patientin eine vermehrte 2-Aminoadipinsäureausscheidung, ein Befund, den auch Casey (1978) erhob. Die Plasmatryptophanspiegel lagen 6 Stunden nach der Gabe noch deutlich über dem Nullwert. Obwohl also der Tryptophanbenzolring zu Nikotinamid insbesondere umgewandelt werden kann, kommt es bei der Patientin unter Belastung offenbar zu einem Anstau von 2-Oxoadipinsäure, die zu 2-Aminoadipinsäure transaminiert und zu 2-Hydroxyadipinsäure reduziert werden kann, und die möglicherweise im Urin zu Glutarsäure dekarboxyliert wurde. Versuche zur Bestimmung anderer Tryptophanmetaboliten wurden von uns nicht unternommen. Wilson u. Mitarb. (1975) konnten bei ihren Probanden (ohne Belastung) keine abnormen Metaboliten nachweisen.

Die Pipecolinsäurebelastung zeigt bei einem verzögerten Abfall des Pipecolinsäureplasmaspiegels - wie er auch von Ghadimi u. Mitarb. (1965) bei einem Hyperlysinämiepatienten mit unbekanntem Enzymdefekt und bei einer Kontrollperson gesehen wurde - eine Vermehrung der 2-Aminoadipinsäureausscheidung 12 - 18 Stunden nach Gabe der Testdosis. Ein Einfluß auf den Lysinspiegel im Plasma läßt sich erwartungsgemäß nicht feststellen. Bei den beiden Patienten mit Hyperpipecolatämie war ebenfalls nach Gabe von Pipecolinsäure keine

Änderung des Lysinspiegels festzustellen, der Abfall der Pipecolatkonzentration im Serum war weit über 48 Stunden verzögert (Gatfield u. Mitarb., 1968 - Thomas u. Mitarb., 1975). Sichere Angaben über die Möglichkeiten, Pipecolinsäure zu verstoffwechseln fehlen bisher für den Menschen. Rattenleber scheint gegenüber Pipecolinsäure weitgehend inert zu sein (Grove und Henderson, 1968 - Boulanger und Mitarb., 1969 - Grove u. Mitarb., 1969), wohingegen in Hühnchenleber L-Pipecolinsäure über Δ_1-Piperidein-6-carbonsäure zu 2-Aminoadipinsäure umgewandelt werden kann (Grove und Roghair, 1971 - Wang und Nesheim, 1972). Die Vermehrung von 2-Aminoadipinsäure, 2-Oxoadipinsäure und daraus entstandener 2-Hydroxyadipinsäure und Glutarsäure im Urin nach Gabe von Pipecolinsäure bei unserer Patientin mit defekter Dekarboxylierung der 2-Oxoadipinsäure kann als Hinweis auf eine Verstoffwechslung der Pipecolinsäure im menschlichen Organismus betrachtet werden.

Insgesamt ergibt sich aus den Untersuchungen an der Patientin eine Bestätigung des Abbaus von Lysin vorwiegend über Saccharopin, über 2-Aminoadiponsäure, 2-Oxoadipinsäure zu Glutaryl-CoA; Aussagen über den Lysinabbau über Pipecolinsäure bleiben spekulativ. Das Zusammentreffen der Abbauwege von Tryptophan und Lysin auf der Stufe von 2-Oxoadipinsäure wird bestätigt.

4.2.2. GLUTARAZIDURIE TYP II

4.2.2.1. Familienanamnese

Der Patient K. war das 4. Kind gesunder türkischer Eltern. Die Eltern stammen beide aus demselben Dorf von etwa 1500 Einwohnern, und sind nach ihren Angaben nicht miteinander verwandt (siehe Stammbaum, Abbildung 28). Das erste Kind der Eltern, ein Junge, starb wenige Stunden nach der Geburt. Weitere frühkindliche Todesfälle in der Verwandtschaft sind nicht bekannt. Zwei gesunde Töchter der Eltern K. leben und eine weitere gesunde Tochter wurde 2 Jahre nach unserem Patienten geboren.

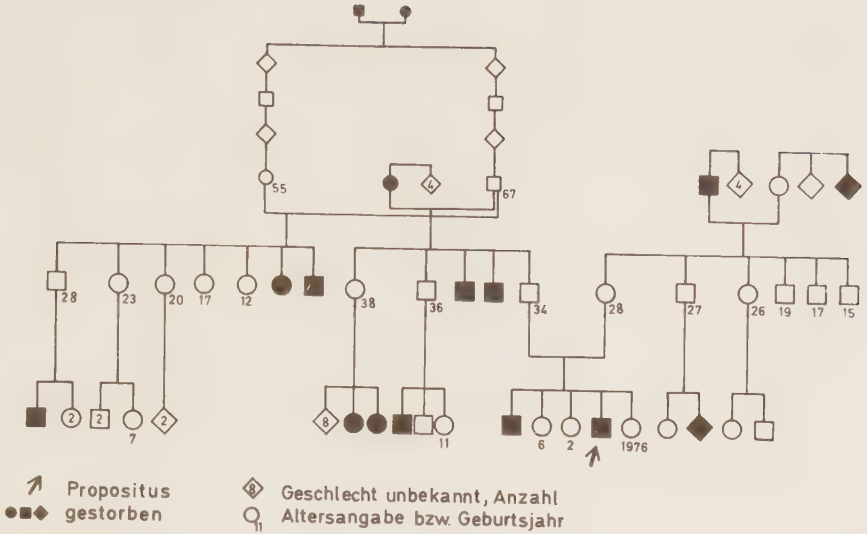


Abbildung 28 : Stammbaum der Familie K.

4.2.2.2. Krankengeschichte

Unser Patient wurde nach unauffällig verlaufener Schwangerschaft spontan am errechneten Termin mit einem Gewicht von 2900 g, einer Länge von 51 cm und einem Kopfumfang von 36 cm geboren. Das Fruchtwasser war mekoniumhaltig. Der Apgarwert betrug 9 nach 1 sowie nach 10 Minuten. Das pH des Nabenarterienblutes war 7,28, des Nabelvenenblutes 7,34.

Wegen beschleunigter Atmung (80 - 100/Min.) und Tachykardie (180 - 200/Min.) wurde das Kind nach 2 1/2 Stunden bereits in die Kinderklinik verlegt.

Der Patient war bei Aufnahme blaß, die Tachypnoe bestand weiterhin. Die linke Lunge erwies sich klinisch als deutlich schlechter belüftet als die rechte.

Unter Inkubatorpflege und Sauerstoffzufuhr schien das Kind sich zu erholen, so daß der Nahrungsaufbau in üblicher Weise mit 2 x 10 ml 5 % Glukose und 1 x 10 ml einer teiladaptierten Säuglingsnahrung begonnen wurde. Im Alter von 18 Stunden wurde der Patient in ein Bett verlegt.

Im Alter von 14 Stunden bestand eine kompensierte metabolische Azidose (pH 7,47, pCO_2 10 Torr, Standard-Bikarbonat 15,1 mÄq/l, Basendefizit -13,0 mÄq/l), die weitere drei Stunden später noch deutlicher wurde (pH 7,33, pCO_2 15,3 Torr, Standard-Bikarbonat 14,0 mÄq/l, Basendefizit -15,1 mÄq/l). Der Blutzucker zu diesem Zeitpunkt betrug 24 mg/100 ml. Es wurde mit der Infusion von 10 %iger Glukose begonnen.

Im Alter von 22 Stunden war die Azetonreaktion im Urin positiv, deshalb wurde das Kind zum Ausschluß einer angeborenen Stoffwechselstörung in die Stoffwechselabteilung übernommen.

Trotz parenteraler Zufuhr von 10 %iger Glukose war im Alter von 30 Stunden keine Blutglukose nachweisbar. Zwei Stunden später kam es zu einem Herz- und Atemstillstand. Die Reanimation gelang

nach Injektion von Glukose. Danach war künstliche Beatmung auf der Intensivstation notwendig. Neigung zu Hypothermie und Bradykardie, sowie Krampfanfälle komplizierten den weiteren Verlauf. Trotz laufender Zufuhr von 20 % Glukose und Natriumbikarbonat konnten die Hypoglykämie und metabolische Azidose nicht beherrscht werden. Im Alter von 44 Stunden fiel erstmals ein unangenehmer Schweißgeruch auf, der von der Haut, von Urin und Blut ausging. Nach zwei weiteren Herzstillständen konnte der dritte, im Alter von 70 Stunden, nicht mehr beherrscht werden. Unter Hypothermie und metabolischer Azidose (pH 6,6) verstarb das Kind.

4.2.2.3. Sektionsbefund (Patholog. Institut der Universität Düsseldorf, Prof. Müntefering)

Auch nach dem Tode bestand der erwähnte süßlich-schweißartige Geruch fort. Es fanden sich: Eine totale Drehungshemmung der primären Darmschleife, eine partielle Atelektase der Lunge, petechiale Blutungen in Pleura, Epikard und Thymuskapsel, eine allgemeine Zyanose, Ödeme der Haut und der inneren Organe, eine diffuse Verfettung der Leber, diffuse Blutungen in Mark und Rinde beider Nebennieren, eine geringe perivenöse Subarachnoidalblutung über beiden Großhirnhemisphären, eine schlaffe Dilatation des Herzens.

4.2.2.4. Allgemeine Untersuchungsbefunde

Neben den erwähnten Befunden der Hypoglykämie, metabolischen Azidose und Azetonurie wurden folgende Befunde erhoben: Das Blutbild war zu Beginn unauffällig, später kam es zu einem Absinken der Thrombozytenzahl auf 47 000/mm^3. Vorübergehend bestand eine Hypokalzämie (5,1 mg/100 Ml) und Hyperkaliämie (7,9 mÄq/l) im Alter von 37 Stunden, die entsprechend therapiert wurden.

Laktat im Blut im Alter von 40 Stunden wurde enzymatisch mit 5,856 uMol/ml bestimmt.

Die bakteriologische Untersuchung der Venenkatheterspitze nach dem Tode ergab Wachstum von E. coli.

4.2.2.5. Spezielle biochemische Untersuchungen

Bei Durchführung unseres Suchtests im Urin auf Stoffwechselstörungen hatten sich folgende abnormen Befunde ergeben: Der Dinitrophenylhydrazin-Test war neben dem Azetest ® schwach positiv. Bei dünnschichtchromatografischer Trennung der Urinaminosäuren fand sich neben einer altersphysiologischen Hyperaminoazidurie eine auffallend stark vermehrte Lysinausscheidung.

4.2.2.5.1. Aminosäuren

Die Plasmaspiegel der Aminosäuren vom zweiten und dritten Lebenstag sind in Tabelle 14 zusammengestellt. Auffallend sind insbesondere die Vermehrung von Lysin und Valin, sowie das Vorhandensein von 2-Aminoadipinsäure.

Die Aminosäurenausscheidung im Urin vom ersten auf den zweiten Lebenstag ist in Tabelle 15 angegeben. Es besteht eine generelle Hyperaminoazidurie, wobei Lysin extrem stark vermehrt ist, ebenso auch Ornithin und Prolin. 2-Aminoadipinsäure und Pipecolinsäure waren beide im Urin nachweisbar, letztere durch zweidimensionale Dünnschichtchromatografie und typische Färbeeigenschaften mit saurem Ninhydrin.

4.2.2.5.2. Organische Säuren

In Tabelle 16 werden die Konzentrationen der nichtflüchtigen extrahierbaren Säuren in Serum vom zweiten und dritten Lebenstag angegeben. Die Konzentration von Glutarsäure war mit 2,273 µMol/ml stark pathologisch; sie ist normalerweise gar nicht im Serum nachweisbar. Auffallend ist auch das Vorhandensein von Äthylmalonsäure, die ebenfalls sonst nicht gefunden wird, und die Erhöhungen von p-Hydroxyphenylmilchsäure und den langkettigen Fettsäuren, insbesondere Palmitinsäure.

Zur Untersuchung der flüchtigen organischen Säuren reichte die vorhandene Serummenge nicht aus.

Tabelle 14 : Aminosäuren im Plasma von Patient K. am zweiten und dritten Lebenstag (/uMol/ml).

	zweiter Lebenstag	dritter Lebenstag	Normalwerte, Neugeborene unter parenteraler Zufuhr von Kohlenhydrat- und Elektrolytlösung zwischen der 28. u. 51. Lebensstunde (Bereich) - Pohlandt (1978)
Taurin	0,355	0,236	0,008 - 0,277
Hydroxyprolin	0,096	0,066	-
Asparaginsäure	z.w.	0,004	-
Threonin	n.g.	0,077	0,017 - 0,158
Serin	n.g.	n.g.	0,016 - 0,216
Glutamin + Asparagin*	0,785	0,498	-
Prolin	0,630	0,202	0,029 - 0,814
Glutaminsäure	z.w.	0,025	0,014 - 0,148
Citrullin	0,106	0,066	0,001 - 0,076
Glycin	0,190	0,157	0,056 - 0,891
Alanin	0,142	0,105	0,038 - 0,528
2-Aminoadipinsäure	z.w.	0,017	-
2-Amino-n-buttersäure	0,027	z.w.	-
Halbcystin	0,108	0,024	0,005 - 0,118
Valin	0,476	0,511	0,013 - 0,213
Methionin	0,043	0,040	0,001 - 0,169
Isoleucin	0,155	0,108	0,002 - 0,104
Leucin	0,281	0,217	0,012 - 0,143
Tyrosin	0,196	0,237	0,015 - 0,165
Phenylalanin	0,085	0,057	0,015 - 0,116
Ornithin	0,227	0,150	0,007 - 0,162
Lysin	0,809	0,782	0,028 - 0,410
Histidin	0,081	0,127	0,010 - 0,142
Arginin	0,082	0,049	0,005 - 0,169

* = Glutamin und Asparagin, berechnet als Glutamin

z.w. = vorhanden, aber zu niedrig zum Auswerten

n.g. = nicht getrennt

Tabelle 15 : Aminosäurenausscheidung im 24-Stunden-Urin vom ersten auf den zweiten Lebenstag von Patient K. (/uMol/24 Std.)

	Patient K.	Normalwerte (n = 10), erste 24 Lebensstunden (Armstrong u. Mitarb., 1964)
Taurin	z.v.	21,20
Hydroxyprolin	41,99	2,27
Threonin	13,26	3,40
Serin	20,40	7,13
Glutamin + Asparagin*	32,81	7,13
Prolin	106,08	1,30
Glutaminsäure	-	0,81
Citrullin	9,52	-
Glycin	64,09	20,74
Alanin	21,93	5,18
2-Aminoadipinsäure	4,25	-
2-Amino-n-buttersäure	z.w.	-
Halbcystin**	51,51	2,43
Valin	9,81	0,65
Cystathionin	4,08	-
Methionin	2,21	vorhanden
Isoleucin	2,21	vorhanden
Leucin	11,05	0,49
Tyrosin	9,69	0,65
Phenylalanin	2,89	0,65
Ornithin	79,73	0,32
Lysin	372,98	4,54
1-Methylhistidin	4,93	1,30
Histidin	18,87	2,92
3-Methylhistidin	6,8	1,78
Arginin	10,37	0,65

* = Glutamin + Asparagin, berechnet als Glutamin
** = überlagert von Pipecolinsäure
z.w. = vorhanden, zu niedrig zum Auswerten
z.v. = zu viel zum Auswerten

Tabelle 16: Nichtflüchtige organische Säuren (Trimethylsilylderivate, extrahierbar mit Essigsäureäthylester) im Serum von Patient K. am zweiten und dritten Lebenstag. (RRT = relative Retentionszeit; I.U. = Integratoreinheiten)

	zweiter Lebenstag		dritter Lebenstag	
	I.U./0,01 ml	uMol/ml	I.U./0,01 ml	uMol/ml
Milchsäure*	64125	3,765	95499	6,400
2-Hydroxybuttersäure*	7658	0,288	5678	0,221
3-Hydroxybuttersäure*	1900	0,087	3163	0,144
Unbekannt, RRT 0,607	2108		791	
Äthylmalonsäure*	3992	0,136	2772	0,100
Glutarsäure*	22601	0,735	69422	2,273
Adipinsäure*	4579	0,130	5120	0,137
Suberinsäure	1271	0,034	221	0,006
Myristinsäure*	2235	0,061	1863	0,053
p-Hydroxyphenylmilchsäure*	3108	0,088	11635	0,275
Palmitoleinsäure*	5196		4353	
Palmitinsäure*	29957	0,570	22298	0,434
Ölsäure*	16524	0,348	14340	0,305
Stearinsäure*	17244	0,327	5763	0,123

* Identität durch Massenspektrometrie gesichert

Die Ausscheidung extrahierbarer nichtflüchtiger Säuren im 24-Std.-Urin vom ersten auf den zweiten Lebenstag von Patient K. ist in Tabelle 17 aufgetragen. Die Ausscheidung von Glutarsäure und auch von Milchsäure ist deutlich vermehrt. Andere Dikarbonsäuren, nämlich Adipinsäure, Suberinsäure, cis-4-Octen-1,8-dicarbonsäure, Sebacinsäure und eine vermutlich ungesättigte Sebacinsäure waren ebenfalls im Urin vermehrt. Wiederum werden größere Mengen von Äthylmalonsäure nachgewiesen. 2-Hydroxybuttersäure, 2-Hydroxyisovaleriansäure und 2-Hydroxyglutarsäure waren vermehrt, während sich 2-Oxoglutarsäure nicht und cis-Aconitinsäure nur in geringer Menge nachweisen ließen. 3-Hydroxybuttersäure war wenig vermehrt nachweisbar.

Die Ausscheidung der flüchtigen Säuren im Urin vom ersten auf den zweiten Lebenstag (Tabelle 18) war vor allem auffällig in bezug auf Vermehrung von Isobuttersäure, Isovaleriansäure und 2-Methylbuttersäure. Die beiden letzteren erscheinen als gemeinsamer Peak, durch Massenspektrometrie wurden aber beide identifiziert Buttersäure, Capronsäure und Propionsäure waren ebenfalls vermehrt. Der größere Teil dieser Substanzen wurde in nicht-konjugierter Form ausgeschieden, was auch den unangenehmen Geruch des Urins erklärt.

4.2.2.5.3. Untersuchungen an kultivierten Fibroblasten

Eine Hautbiopsie war im Alter von 61 Stunden entnommen worden.

Abbaustudien mit intakten Fibroblastenkulturen zeigten im Falle des Patienten K. im Vergleich zu fünf normalen Zellinien eine deutlich verminderte Fähigkeit, Glutarsäure und die verzweigtkettigen Aminosäuren abzubauen, wobei Valin stärker betroffen zu sein scheint, als Leucin und Isoleucin. Ebenso ist der Abbau von 2-Oxoisovaleriansäure stärker beeinträchtigt als der von 2-Oxoisocapronsäure. Die Oxidation von Pyruvat dagegen war vergleichbar mit der in den Kontrollen (Tabelle 19).

Tabelle 17 : Nichtflüchtige organische Säuren (extrahierbar mit Essigsäureäthylester, Trimethylsilylderivate) im Urin von Patient K.

	Patient K.			Kontrollen (n = 5) 0 - 1 Jahr alt
	I.U./0,025 ml	uMol/l	uMol/g Kreatinin	uMol/g Kreatinin
Milchsäure	339175	7777	91503	< 433
2-Hydroxybuttersäure*	21868	327	3894	< 10 uMol/l
3-Hydroxybuttersäure*	12000	221	2577	< 250
2-Hydroxyisovaleriansäure*	7000	76	881	< 40
Äthylmalonsäure*	31513	430	5061	< 350
Unbekannt RRT 0,765	5409			fehlt
Glutarsäure*	554050	7273	85561	< 100
Adipinsäure*	65754	705	8315	< 120
2-Hydroxyglutarsäure*	9427			< 2500 I.U.
cis-4-Octen-1,8-dicarbonsäure*	7382			fehlt
Suberinsäure	13545	138	1621	< 50
p-Hydroxyphenylmilchsäure	39900	316	3725	
Unbekannt RRT 1,431** möglicherweise ungesättigte Sebacinsäure	16167			unbekannt
Sebacinsäure * + ***	11552	162	1911	unbekannt

* = Identität durch Massenspektrometrie erwiesen

** = interferiert mit 3-m-Hydroxyphenylhydracrylsäure

*** = interferiert mit Vanilglykolsäure

Tabelle 18 : Gesamte flüchtige Säuren im 24-Std.-Urin von Patient K.

	Patient K.		Kontrollen (n=5) 0 - 1 Jahr alt
	uMol/l	uMol/g Kreatinin	uMol/g Kreatinin
Propionsäure	81	959	101 - 162
Isobuttersäure	1159	13636	110 - 240
n-Buttersäure	295	3477	0 - 57
Isovaleriansäure + 2-Methylbuttersäure*	1216	14294	10 - 59
Capronsäure	67	783	0 - 9

* = nicht getrennt, Vorhandensein durch Massenspektrometrie erwiesen, berechnet als Isovaleriansäure.

Tabelle 19 : Degradation von ^{14}C-markierten Substraten durch Fibroblasten von Patient K. im Vergleich zu fünf Kontrollinien (pMol $^{14}CO_2$ gebildet pro 10 µg Zellprotein pro 4 Stunden).

	[1,5-^{14}C]-Glutarsäure	[U-^{14}C]-L-Valin	[U-^{14}C]-L-Leucin	[U-^{14}C]-L-Isoleucin	[U-^{14}C]-2-Oxoisovaleriansäure	[U-^{14}C]-2-Oxoisocapronsäure	[1-^{14}C]-Brenztraubensäure
Konzentration im Inkubationsmedium	$2,8 \times 10^{-4}$ M	$9,5 \times 10^{-5}$ M	$11,8 \times 10^{-5}$ M	$0,6 \times 10^{-5}$ M	$3,3 \times 10^{-5}$ M	$1,4 \times 10^{-5}$ M	$4,6 \times 10^{-5}$ M
Patient K.	7,6	14,9	6,0	3,6	0,2	26,4	263,0
Kontrollen							
D.W.	35,3	76,5	-	-	-	100,2	248,1
V.B.	66,9	125,0	11,0	14,4	29,2	105,6	280,2
M.B.	62,0	122,8	10,5	13,8	9,2	57,2	419,5
H.R.	47,3	100,2	10,2	12,2	14,3	91,5	-
H.B.	55,2	78,0	13,0	13,5	21,9	137,7	-

In Fibroblastenhomogenaten aus derselben Zellinie des Patienten wurde die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität normal gefunden (4,26 nMol CO_2/Std./mg Protein; normale Kontrollen 1,8 - 4,8 nMol CO_2/Std./mg Protein; 2 Patienten mit Glutarazidurie 0,08 und 0,002 nMol CO_2/Std./mg Protein); sowohl ohne als mit Zusatz von FAD zum Inkubationsmedium. Diese Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe S.I. Goodman (John F. Kennedy Child Development Center, The B.F. Stolinsky Research Laboratories, University of Colorado Medical Center, Denver, Colorado, U.S.A.) durchgeführt.

Diese Arbeitsgruppe führte zwei weitere Untersuchungen durch:

1. Die Wachstumsrate und Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität der Fibroblasten in Medien absteigender Riboflavinkonzentration entsprachen der von normalen Kontrollzellen;

2. die Syntheseraten von Flavinadenidinucleotid und Flavinmononucleotid aus ^{14}C-Riboflavin, das dem Inkubationsmedium zugesetzt wurde, waren in den Fibroblasten des Patienten K. mit denen von Normalzellen vergleichbar.

4.2.2.5.4. Untersuchungen an Familienangehörigen

Der Plasmalysinspiegel von Vater und Mutter des Patienten K. betrug 0,301 bzw. 0,247 µMol/ml. Die Konzentrationen anderer organischer Säuren waren normal, insbesondere war Glutarsäure nicht nachweisbar.

Bei einer nachfolgenden Schwangerschaft der Mutter wurde in der 16. Schwangerschaftswoche eine Amnionzentese zur Gewinnung von Fruchtwasser für direkte biochemische und für enzymatische Untersuchungen an Amnionzellkulturen durchgeführt.

Die Konzentrationen von Aminosäuren und organischen Säuren im Fruchtwasser und gleichzeitig gesammeltem mütterlichen Urin waren normal.

Amnionzellkulturen zeigten eine normale Fähigkeit, Valin, Leucin, Isoleucin und Glutarsäure abzubauen, im Vergleich zu normalen Amnionzellkulturen und Fibroblastenkulturen (Abbildung 29).

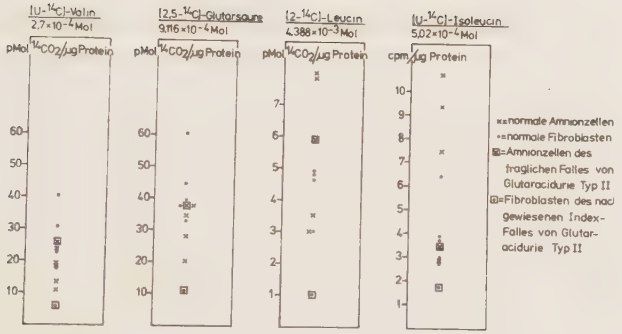


Abbildung 29 : Abbau von [U-^{14}C]-Valin, [2-^{14}C]-Leucin, [U-^{14}C]-Isoleucin und [2,5-^{14}C]-Glutarsäure, ausgedrückt in pMol $^{14}CO_2$/µg Protein bzw. cpm/µg Protein, in Kulturen normaler Amnionzellen (x), normaler Fibroblasten (.), Amnionzellen des zu untersuchenden Kindes ([x]) und Fibroblasten des Patienten K. ([.]).

Das Kind, ein Mädchen, wurde am errechneten Termin durch Sectio caesarea entbunden. Geburtsgewicht 3050 g, Länge 50 cm, Kopfumfang 36 cm, Apgarwert nach 1 Minute 8, nach 5 und 10 Minuten jeweils 9. Es erschien klinisch unauffällig und wurde 18 Tage lang in der Kinderklinik beobachtet und durchuntersucht. Dabei ergab sich, wie pränatal diagnostiziert, kein Anhalt für das Vorliegen einer Stoffwechselstörung.

4.2.2.7. DISKUSSION

Die Interpretation dieses Falles hat zum einen das sehr komplexe Metabolitenspektrum zu berücksichtigen, zum anderen die an Fibroblastenkulturen gewonnenen Daten über Stoffwechselkapazitäten.

4.2.2.7.1. Abgrenzung gegen das Krankheitsbild der Isovalerianazidämie

Das klinische Bild, insbesondere der auffallende Geruch des Patienten, hatten vorerst an eine Isovalerianazidämie denken lassen, für die dieser Geruch ("sweaty feet") typisch ist. Hierbei handelt es sich um eine vergleichsweise seltene Störung im Leucinabbau auf der Stufe der Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase (Tanaka u. Mitarb.,1966 - Tanaka u. Mitarb., 1976 a). Man findet erhöhte Isovaleriansäurespiegel im Serum und im Urin Isovaleriansäure, Isovalerylglycin (Tanaka und Isselbacher, 1967) und 3-Hydroxyisovaleriansäure (Tanaka u. Mitarb., 1968). Der gleiche auffallende Geruch wurde von Sidbury u. Mitarb. (1967) bei fünf Kindern aus zwei nicht miteinander verwandten Familien beschrieben. Diese Kinder waren in den ersten Lebensmonaten gestorben mit den Zeichen der Azidose, Dehydratation und Krämpfen. Da sie im Urin große Mengen von Substanzen ausschieden, die sich wie Butyrat und Capronat verhielten, glaubte man an einen ursächlichen Defekt der grünen Azyl-CoA-Dehydrogenase, die verantwortlich ist für den Abbau von C_4- und C_6-Fettsäuren (Green u. Mitarb., 1954). Allerdings zeigten spätere Untersuchungen an Urinen aus einer von Sidbury's Familien, daß es

sich um Fälle von Isovalerianazidämie gehandelt hatte (Ando u. Mitarb., 1973), so daß die Natur der Krankheit in der anderen Familie zweifelhaft bleibt.

Der klinische Verlauf bei den bisher beschriebenen Fällen von Isovalerianazidämie war sehr unterschiedlich, mit Tod in den ersten Lebenstagen (Newman u. Mitarb., 1967) oder geistiger Retardierung und neurologischer Auffälligkeit nach rezidivierenden Attacken von Eßunlust, Erbrechen, Anorexie und dem Auftreten des typischen Geruchs.

Hypoglykämien wurden jedoch in keinem bisher beschriebenen Fall beobachtet, standen bei unserem Patienten aber mit im Vordergrund des klinischen Bildes, da sie auch unter Glukoseinfusionen eintraten.

Neben einer vermehrten Isovaleriansäureausscheidung bei unserem Patienten - Isovalerylglycin konnte nicht in nennenswerter Menge nachgewiesen werden - fand sich auch Isobuttersäure und wahrscheinlich 2-Methylbuttersäure erhöht im Urin. Diese drei Metaboliten entsprechen vergleichbaren Abbaustufen im Stoffwechsel von Leucin, Valin bzw. Isoleucin, wobei als nächster Schritt jeweils eine Dehydrogenierungsreaktion mit Bildung einer Doppelbindung erfolgt. Einen Hinweis auf einen gestörten Abbau der drei verzweigtkettigen Aminosäuren geben auch die Inkubationsversuche der kultivierten Fibroblasten dieses Patienten mit ^{14}C-markierten Aminosäuren und ^{14}C-markierter 2-Oxoisovaleriansäure und 2-Oxoisocapronsäure.

4.2.2.7.2. Abgrenzung gegenüber dem Krankheitsbild der Dikarboxylazidurie

In der Literatur wurde über drei Fälle von Dikarboxylazidurie berichtet.

Borg u. Mitarb. (1972) und später Lindstedt u. Mitarb. (1976), schilderten die klinischen und chemischen Befunde eines Patienten aus einer Verwandtenehe, der am 2. Lebenstag mit schwerer Azidose und Hypoglykämie starb. Im Urin fand sich eine 300 - 1000-fach vermehrte Laktatausscheidung, darüberhinaus eine Vermehrung von Adi-

pinsäure (28fache des Normalen), Suberinsäure (10fach), Sebacinsäure (40fach), Laurinsäure (300fach), cis-5-Decen-1,10-dicarbonsäure, cis-5-Dodecen-1,12-dicarbonsäure, cis-5-Tetradecen-1,14-dicarbonsäure, trans-3-Decen-1,10-dicarbonsäure, trans-3-Dodecen-1,12-dicarbonsäure. Alle diese Substanzen waren auch im Serum vermehrt vorhanden. Ursächlich wurde ein Defekt der ß-Oxidation mittelkettiger Fettsäuren auf der Stufe der Azyl-CoA-Dehydrogenase diskutiert. Da ein Geschwisterkind ebenfalls früh unter denselben klinischen Zeichen verstorben war, ist ein genetischer Defekt möglich.

Ein weiterer Patient wurde von Gregersen u. Mitarb. (1976) beschrieben, der nach rezidivierenden Attacken von Lethargie und Koma, verbunden mit metabolischer Azidose und Hypoglykämie, im Alter von 2 1/2 Jahren verstarb. Ohne nennenswerte Ketonurie schied er stark vermehrt Adipinsäure, Suberinsäure, Sebacinsäure und Suberylglycin aus. Auch hier wird ein Defekt der ß-Oxidation mittelkettiger Fettsäuren mit Omega-Oxidation der angestauten Metabolite vermutet.

Tanaka u. Mitarb. (1977) beschrieben eine Patientin von 4 1/2 Jahren mit rezidivierender schwerer Hypoglykämie, Lethargie und Koma, deren Metabolitenmuster im Urin möglicherweise Folge eines Butyryl-CoA-Dehydrogenasemangels war. Es fanden sich unter normaler Ernährung Äthylmalonsäure (4,77 - 5,9 mMol/g Kreatinin; normal 0,023 $\pm$ 0,023 S.D.), Adipinsäure (1,44 - 5,07 mMol/g Kreatinin; normal 0,014 - 0,062) und Capronylglycin (1,1 - 2,25 mMol/g Kreatinin; normal nicht nachweisbar) in großer Menge im Urin. In einzelnen Proben wurde auch Glutarsäure (0,61 - 1,82 mMol/g Kreatinin) und Suberinsäure, Sebacinsäure und Decendicarbonsäure nachgewiesen. Der postulierte Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Defekt würde zu einem Anstau von Butyryl-CoA und Capronyl-CoA führen. Aus dem ersteren könnte durch die Propionyl-CoA-Carboxylase Äthylmalonsäure entstehen, aus dem letzteren entweder durch Konjugation mit Glycin über die Glycin-N-Azylase Capronylglycin oder durch Omega-Oxidation Adipinsäure.

Unser Patient schied zwar auch vermehrt Butyrat und Capronat aus, allerdings in geringerer Menge als Isobutyrat und Isovalerat plus 2-Methylbutyrat.

4.2.2.7.3. Abgrenzung gegen das Krankheitsbild der Glutarazidurie mit Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defekt

Der auffälligste Befund in der gaschromatografischen Analyse, der nichtflüchtigen Fettsäuren war jedoch bei dem Patienten K. die exzessive Vermehrung von Glutarsäure. Sie liegt mit 85 mMol/g Kreatinin bedeutend höher als in normalen Urinproben (Nordmann u. Mitarb., 1954 - Thomas und Stalder, 1959 - Mamer u. Mitarb.,1971) oder in Proben von Patienten mit Ketosen (Pettersen u. Mitarb., 1972), ist aber vergleichbar mit der bei zwei Patienten mit Glutarazidurie und nachgewiesenem Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defekt (Goodman u. Mitarb., 1974). Bei diesem Defekt ist die Glutarsäureausscheidung abhängig von der Lysinzufuhr mit der Nahrung; verminderte Ausscheidung nach diätetischer Behandlung führte jedoch zu keiner neurologischen Besserung (Goodman u. Mitarb., 1974 - Kyllerman und Steen, 1977). Alle fünf bisher beschriebenen Patienten schieden außerdem 3-Hydroxyglutarsäure und Glutaconsäure aus, zwei von ihnen auch abnorme Mengen von 2-Oxoglutarsäure, 2-Aminoadipinsäure und Glutarylglycin (Gregersen u. Mitarb., 1977 b). Einer der beschriebenen Patienten hatte konstant eine kompensierte metabolische Azidose und von zwei Patienten wird berichtet, daß bei Infekten eine dekompensierte metabolische Azidose auftrat, die bei einem von ihnen tödlich endete. Derselbe Patient hatte mehrfach gleichzeitig Hypoglykämien gehabt. Verminderte $^{14}CO_2$-Freisetzung aus [1,5-^{14}C]-Glutaryl-CoA durch Lysate von Leukozyten (Goodman u. Mitarb., 1975 - Gregersen u. Mitarb., 1977) und Fibroblasten (Goodman und Kohlhoff, 1975) und durch Lebermitochondrien (Goodman u. Mitarb., 1977) und fehlende Markierung von Glutaconat und 3-Hydroxyglutarat im Inkubationsmedium (Goodman u. Mitarb., 1977) weisen auf einen Defekt der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase hin. Intakte Leukozyten konnten [1,5-^{14}C]-Glutarsäure dagegen normal verstoffwechseln (Goodman u. Mitarb., 1975 - Gregersen u. Mitarb., 1977).

Im Gegensatz dazu zeigten intakte Fibroblasten unseres Patienten einen verminderten Abbau von [1,5-^{14}C]-Glutarsäure und normale Glutaryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität und unterscheiden sich damit deutlich von den oben genannten Patienten.

Der Serumglutaratspiegel des Patienten K. war exzessiv erhöht - 2,3 µMol/ml, gegenüber bis zu 0,045 µMol/ml der Patienten mit Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defekt - und Lysin sowie 2-Aminoadipinsäure waren im Plasma und Urin vermehrt. Ebenso konnte ein weiterer Metabolit des Lysins, Pipecolinsäure, im Urin nachgewiesen werden. Sekundäre Störungen im Lysinabbau können dafür verantwortlich sein. In ähnlicher Weise fand sich bei einem Patienten mit Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Defekt eine vermehrte 2-Aminoadipinsäure- und Saccharopinausscheidung kurz vor dem Tode (Goodman u. Mitarb., 1977).

4.2.2.7.4. Abgrenzung gegen das durch Hypoglycin hervorgerufene Krankheitsbild

Es besteht eine verblüffende Ähnlichkeit vieler chemischer Befunde unseres Patienten mit denen, die durch Hypoglycin am Menschen und an Tieren hervorgerufen werden.

Hypoglycin (L-2-Amino-3-methylencyclopropylpropionsäure) ist das Toxin der unreifen Frucht von Blighia sapida (Hassall u. Mitarb., 1954 - Hassall und Reyle , 1955 - von Holt und Leppla, 1958) und ruft das unter dem Namen "Jamaican vomiting sickness" bekannte Krankheitsbild hervor. Dabei handelt es sich um eine akut eintretende Krankheit vorwiegend von Kindern der unterernährten Bevölkerung von Jamaica nach Genuß der unreifen Früchte, mit Erbrechen, Benommenheit, Krämpfen, Koma und früher hoher Mortalität, wobei schwere Hypoglykämien und Glykogenverarmung und diffuse Verfettung der Leber auftreten (Jelliffe und Stuart, 1954).

Hypoglycin wird im Organismus zu Methylencyclopropylessigsäure metabolisiert (von Holt, 1966), dessen Coenzym-A-Ester das eigentlich aktive Agens ist.

Seine hypoglykämisierende Wirkung erwies sich auch in Tierversuchen an Ratten (Hassall u. Mitarb., 1954), die außerdem eine Verfettung der Leber entwickelten. Der Tod der Tiere konnte durch Vorbehandlung mit Riboflavin verhindert werden (von Holt und von Holt, 1959). Fettsäuren mit 12 bis 18 C-Atomen wurden vermindert oxidiert, während C_4- bis C_{10}-Fettsäuren normal verstoffwechselt wurden (von Holt und Benedict, 1959 - von Holt u. Mitarb., 1966). Die Aktivität der Palmityl-CoA: Carnitinazyltransferase in Myokardhomogenaten war vermindert, während Carnitinbehandlung der Tiere diese Aktivität normalisierte und die Hypoglykämie verhinderte (Entman und Bressler, 1967). Daraus wurde die Hypothese entwickelt, daß die Verminderung der Oxidation der langkettigen Fettsäuren eine Folge der Verarmung an freiem (-)-Carnitin und Coenzym A sei, die mit Methylencyclopropylessigsäure nicht weiter metabolisierbare Ester bildeten (Corredor u.Mitarb., 1967). Dadurch würde der Transport der langkettigen Fettsäuren als Carnitinester in die Mitochondrien vermindert, geringere Bildung von ATP und reduziertem NAD durch fehlende ß-Oxidation führe zu verminderter Glukoneogenese (Ruderman u. Mitarb., 1968 - Corredor u. Mitarb., 1967) und schließlich nach Verbrauch der Glykogenvorräte zu Hypoglykämie (Sherratt, 1969).

Spätere Untersuchungen konnten eine direkte Hemmung der ß-Oxidation durch Methylencyclopropylacetyl-CoA (Osmundsen und Sherratt, 1975) in Mitochondrien aus Rattenleber nachweisen. Eine Hemmung der Palmityl-CoA-Dehydrogenase dagegen war nicht nachweisbar. Capronylcarnitin und Butyrylcarnitin konnten nicht oxidiert werden. Die Hemmung der Oxidation von Azylcarnitin-Estern nahm mit zunehmender Kettenlänge zu, wahrscheinlich als Folge der Akkumulation von kurzkettigem Azyl-CoA in der Matrix. Die ß-Oxidation langkettiger Fettsäuren ist also unvollständig und geht nur bis zu Butyryl-CoA, das sich anstaut. Azyl-CoA-Hydrolasen in der Mitochondrienmatrix mit relativ hohen K_m-Werten sorgen bei Überschreiten einer kritischen Konzentration an Azyl-CoA durch Freisetzen des Coenzyms A für einen konstanten Spiegel an freiem CoA

und erlauben damit eine limitierte ß-Oxidation (Sherratt und Osmundsen, 1976).

Weiter zeigte sich, daß Methylencyclopropylessigsäure die Dehydrogenierung anderer kurz- und mittelkettiger Azyl-CoA-Ester in vitro hemmt, so die Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase, die 2-Methylbutyryl-CoA-Dehydrogenierung und die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (Tanaka u. Mitarb., 1971 - Osmundsen und Sherratt, 1975 - Tanaka, 1975 - Kean, 1976) und im Tierexperiment die Ausscheidung von Isovaleriansäure, Isovalerylglycin, 2-Methylbuttersäure, 3-Hydroxyisovaleriansäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Suberinsäure, Sebacinsäure, cis-4-Decen-dicarbonsäure, cis,cis-4,7-Decadien,1,10-dicarbonsäure, cis-4-Octen-1,8-dicarbonsäure, N-n-Butyrylglycin, N-2-Methylbutyrylglycin und von N-(Methylencyclopropyl)acetylglycin provoziert (Tanaka, 1972 - Tanaka, 1975). Die Serumkonzentrationen von Buttersäure, Isovaleriansäure und 2-Methylbuttersäure steigen bei Ratten stark an (Tanaka u. Mitarb., 1972).

Die Aktivierung der Pyruvatcarboxylase durch Acetyl-CoA ist kompetiv hemmbar durch Butyryl-CoA und Isovaleryl-CoA (Billington u. Mitarb., 1976). Eine Erhöhung des Azyl-CoA/Acetyl-CoA-Quotienten in der Mitochondrienmatrix durch teilweise Hemmung der ß-Oxidation und des Leucinabbaus durch Hypoglycinmetaboliten würde also zu einer verminderten Bildung von Oxalacetat aus Pyruvat führen und damit zu verminderter Glukoneogenese ausgehend von Pyruvat, Laktat und Alanin.

Eine Hemmung der Glukoneogenese durch Hypoglycin konnte in Ratten direkt nach Injektion von [U-^{14}C,2-^{3}H]-Glukose und Verfolgung der Änderungen in der Markierung von Blutglukose gezeigt werden (Osmundsen u. Mitarb., 1978). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen fand sich dabei jedoch ein verminderter Glukoseumsatz.

Zwei weitere Fakten können zur Erklärung der hypoglykämisierenden Wirkung herangezogen werden:

1. Die Stimulation der Insulinfreisetzung durch Hypoglycin, nachgewiesen in Kaninchenpankreas in vitro (Milner u. Wirdnam,1977),

2. die nachweisliche Verminderung der mitochondrialen Malat-Akkumulation durch Glutaryl-CoA, das sich aufgrund der Hemmung der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase anstaut (Tanaka und Kerley, 1975).

Die Untersuchung des Metabolitenmusters in Serum und Urin von zwei Patienten mit Hypoglycin-Vergiftung bestätigte viele der tierexperimentellen Befunde (Tanaka u. Mitarb., 1976 b). Capronsäure, Isobuttersäure, n-Buttersäure, Isovaleriansäure plus 2-Methylbuttersäure waren im Serum der Patienten bis zum 23fachen des Normalen vermehrt. Im Urin fanden sich vermehrt vor allem Adipinsäure und Glutarsäure, 2-Äthylmalonsäure (Tanaka u. Mitarb., 1976 c), Suberinsäure, Sebacinsäure, 2-Methylbernsteinsäure, 3-Hydroxyisovaleriansäure, 4-Octendicarbonsäure, 4-Decendicarbonsäure; im Vergleich zu Ratten geringe Mengen von Isovalerylglycin, Capronylglycin (Baretz u. Mitarb., 1976) und Butyrylglycin, daneben die kurzkettigen Fettsäuren Capronsäure (vorwiegend in konjugierter Form, jedoch nur 20 - 40 % als Glycinkonjugat), Buttersäure, Isobuttersäure, Propionsäure und Isovaleriansäure. Methylencyclopropylessigsäure wurde ebenfalls im Urin nachgewiesen, womit die Ingestion von Hypoglycin bewiesen ist.

2-Äthylmalonsäure hatte sich nur in geringer Konzentration im Urin Hypoglycin-vergifteter Ratten gefunden, die dafür größere Mengen an Butyrylglycin ausschieden. Die Entstehung von Äthylmalonsäure ist über zwei Mechanismen möglich: den Metabolismus des Isoleucins über 2-Äthylhydracrylsäure (Stalder, 1959 - Mamer u. Mitarb., 1976) und die Karboxylierung von Butyryl-CoA (Hegre u. Mitarb., 1959 - Stern u. Mitarb., 1959). Substituierte Malonsäuren können den mitochondrialen Malattransport und somit die Glukoneogenese hemmen (Halperin u. Mitarb., 1971), so daß der Anstau der Äthylmalonsäure als weiterer pathogenetischer Faktor in der Ausbildung der Hypoglykämien in Frage kommt.

Die Ausscheidung von Dikarbonsäuren bei den beiden Patienten mit Hypoglycinvergiftung war offenbar nicht die Folge einer bestehenden Ketose.

Bei Patienten mit Ketoazidosen verschiedener Ätiologie ist das Auftreten einer vermehrten Ausscheidung von Adipinsäure, Suberinsäure, weniger von Bernsteinsäure und Glutarsäure (Pettersen u. Mitarb., 1972), sowie auch von 2-Hydroxy- und 3-Hydroxyisovaleriansäure, 3-Hydroxyisobuttersäure, 2-Methyl-3-hydroxybuttersäure (Landaas, 1974 - Landaas, 1975 - Landaas und Jacobs, 1977) ein bekanntes Phänomen. Die Entstehung der Dicarbonsäuren wird erklärt durch Omega-Oxidation langkettiger Fettsäuren und nachfolgende ß-Oxidation (Pettersen, 1972).

Die Hypoglycinvergiftung des Menschen ist nicht mit einer Ketose vergesellschaftet. Hier wäre eine Hemmung des transmitochondrialen Transportes der langkettigen Fettsäuren und eine Hemmung der Dehydrogenierung von 6 - 10 C-Atomen enthaltenden Dicarboxyl-CoA-Estern zu postulieren.

Bei der Schilderung der klinischen und biochemischen Befunde, die eine Hypoglycinvergiftung hervorruft, sind bereits die Ähnlichkeiten mit den Befunden unseres Patienten K. deutlich geworden: schwere Hypoglykämie und Leberverfettung, Ausscheidung von Glutarat, Adipat, Äthylmalonat, Suberat, Sebacat, 4-Oc̈ten-1,8-dicarbonsäure, von Isobutyrat, Isovalerat plus 2-Methylbutyrat, Butyrat, Capronat.

4.2.2.7.5. Abgrenzung gegenüber dem Reye-Syndrom

Damit sind auch bereits die Unterschiede zu den bei Patienten mit Reye-Syndrom erhobenen Befunden genannt. Bei diesem Krankheitsbild, das mit Hyperammoniämie, Hyperaminoazidämie, Prothombinverminderung, Enzephalopathie und fettiger Degeneration innerer Organe einhergeht, wurden im Serum Propionsäure, Isobuttersäure, Buttersäure, Isovaleriansäure und Valeriansäure auf das 3- bis 10-fache des Normalen erhöht gefunden (Trauner u. Mitarb., 1977), ebenso Caprylsäure auf das 13- bis 1500fache (Mamunes u. Mitarb., 1974) neben Vermehrung der freien Fettsäuren. Im Urin von Patienten mit Reye-Syndrom waren Adipinsäure (Harrington u. Mitarb., 1977), 4-Hydroxyphenylessigsäure, Suberinsäure, Methyladipinsäure,

Octendicarbonsäure, Decendicarbonsäure, Sebacinsäure und möglicherweise 4-Hydroxy-3-methylvaleriansäure vermehrt vorhanden (Chalmers u. Mitarb., 1977). Es fehlten jedoch vor allem Glutarat und Äthylmalonat.

In unserem Falle überwog jedoch die Glutarsäurekonzentration die aller anderen Metaboliten, die Spiegel der kurzkettigen Fettsäuren übertreffen die der bei den Hypoglycin-vergifteten Patienten beschriebenen.

Der Patient K. wies ebenfalls nur eine mäßige Ketonurie auf (die 3-Hydroxybutyratausscheidung betrug etwa das 10fache des Normalen).

4.2.2.7.6. Stoffwechseldefekte der Glutazidurie Typ II

Die Abbaustudien in intakten Fibroblasten deuten auf eine Störung des Glutaratstoffwechsels hin; der Abbau von Valin und Oxoisovaleriansäure erscheint stärker beeinträchtigt als der von Leucin und Isoleucin, im Gegensatz zu den unter Hypoglycineinwirkung gesehenen Veränderungen.

Eine Aktivitätsverminderung der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase bestand bei unserem Patienten jedoch nicht.

Der Anstau einer Reihe von Metaboliten (Glutarsäure, Isovaleriansäure, 2-Methylbuttersäure und Isobuttersäure und kurzkettiger Fettsäuren), deren Coenzym A-Ester alle einer Dehydrogenierungsreaktion unterzogen werden, erlaubt die folgenden pathogenetischen Spekulationen:

1. Fehlen oder Veränderung einer allen Azyl-CoA-Dehydrogenasen gemeinsamen Komponente: dieses ist unwahrscheinlich bei nachgewiesener normaler Glutaryl-CoA-Dehydrogenase Aktivität in Fibroblasten.

2. Fehlen eines Koenzyms der Reaktion durch
   a) mangelnde Synthese
   b) Transportstörungen oder
   c) defekte Bindung an das (veränderte) Apoenzym:

Für flavinabhängige Reaktionen wurde dies durch die Untersuchungen in Fibroblasten unwahrscheinlich gemacht, es sei denn, ein solcher Defekt hätte in anderen Körperorganen bestanden.

3. Die Bildung eines Inhibitors, den wir nicht nachweisen konnten.
4. Eine gestörte Elektronenübertragung aus der FAD-abhängigen Dehydrogenierungsreaktion auf einen gemeinsamen Akzeptor.

Der primäre Defekt läßt sich aus den Untersuchungen nicht erkennen. Wegen der kurzen Lebenszeit des Patienten sind eine Reihe von Fragen unbeantwortet geblieben, so konnten insbesondere keine Informationen über therapeutische Möglichkeiten gewonnen werden. Angezeigt gewesen wären Versuche mit Riboflavinsubstitution in höheren Dosen und mit Carnitin, in Anlehnung an die Ergebnisse mit Hypoglycin-vergifteten Ratten von von Holt und von Holt (1959) und von Entman und Bressler (1967), obwohl Sherratt und Osmundsen (1976) die letzteren nicht bestätigen konnten. Vielleicht können diese Untersuchungen an einem ähnlichen Fall einer 19jährigen Patientin mit Glutaracidurie, Ausscheidung kurzkettiger Fettsäuren und Hypoglykämie, der uns von Tanaka mitgeteilt wurde, durchgeführt werden.

Die Frage nach der praenatalen Diagnostik dieser Stoffwechselstörung wäre nur durch Untersuchungen an einem ebenfalls betroffenen Feten zu beantworten.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ando,T., Nyhan,W.L., Bachmann,C., Rasmussen,K., Scott,R., Smith,E.K.:
Isovaleric acidemia: Identification of isovalerate, isovalerylglycine and 3-hydroxyisovalerate in urine of a patient previously reported as having butyric and hexanoic acidemia.
J.Pediatr.82, 243-248, 1973

2. Armstrong,M.D. Robinow,M.:
A case of hyperlysinemia: biochemical and clinical observations.
Pediatrics 39, 546-554, 1967

3. Armstrong,M.D., Stave,U.:
A Study of Plasma Free Amino Acid Levels. II. Normal Values for Children and Adults.
Metabolism 22, 561-569, 1973

4. Baretz,B.H., Ramsdell,H.S., Tanaka,K.:
Identification of hexanoylglycine in urines from two patients with Jamaican vomiting sickness.
Clin.Chim.Acta 73, 199-202, 1976

5. Benson,P.F., Swift,P.N., Young,V.K.:
Hydroxylysinuria.
Arch.Dis.Child. 44, 134-135, 1969

6. Berridge,B.J.,Jr., Chao,W.R., Peters,J.H.:
Column chromatographic analysis of tryptophan with the basic amino acids.
Anal.Biochem. 41, 256-264, 1971

7. Besrat,A., Polan,C.E., Henderson,L.M.:
Mammalian Metabolism of Glutaric Acid.
J.Biol.Chem. 244, 1461-1467, 1969

8. Billington,D., Osmundsen,H., Taylor,J.R.:
The effect of hypoglycin on some parameters of glucose metabolism.
Biochem.Soc.Trans. 4, 1035-1038, 1976

9. Bindel,T.H., Fennessey,P.V., Miles,B.S., Goodman,S.I.:
4-Hydroxycyclohexane-1-carboxylic acid: An unusual compound isolated from the urine of children with suspected disorders of metabolism.
Clin.Chim.Acta 66, 209-217, 1976

10. Bird,E.D., Mackay,A.V.P., Rayner,C.N., Iversen,L.L.:
Reduced glutamic acid-decarboxylase activity of post-mortem brain in Huntington's chorea.
Lancet I, 1090-1092, 1973

11. Borg,L., Lindstedt,S., Steen,G.:
Aliphatic C_6 - C_{14} dicarboxylic acids in urine from an infant with fatal congenital lactic acidosis.
Clin.Chim.Acta 41, 363-366, 1972

12. Borsook,H., Deasy,C.L., Haagen-Smit,A.J., Keighley,G., Lowy,P.H.:
α-Aminoadipic acid: a product of lysine metabolism.
J.Biol.Chem.173, 423-424, 1948 a

13. Borsook,H., Deasy,C.L., Haagen-Smit,A.J., Keighley,G., Lowy,P.H.:
The degradation of L-lysine in guinea pig liver homogenate: formation of α-aminoadipic acid.
J.Biol.Chem.176, 1383-1393, 1948 b

14. Borsook,H., Deasy,C.L., Haagen-Smit,A.J., Keighley,G., Lowy,P.H.:
The degradation of α-aminoadipic acid in guinea pig liver homogenate.
J.Biol.Chem.176, 1395-1400, 1948 c

15. Boulanger,P., Bertrand,J., Osteux,R.: Désamination de l'ornithine et de la lysine sélectivement marquées par l'aminoacidedéshydrogénase du foie de dindon (Meleagris gallopavo L.).
Biochim.Biophys.Acta 26, 143-145, 1957

16. Boulanger,P., Osteux,R., Sacquet,E., Charlier,H.:
La dégradation de la L-Lysine chez le rat "germ-free".
Biochim. Biophys. Acta 184, 338-344, 1969

17. Boulanger,P., Mizon,J.:
La destinée de groupements aminés alpha et epsilon de la lysine dans le foie de rat in vitro.
Biochim.Biophys.Acta 451, 161-169, 1976

18. Bowden,J.A., Brestel,E.P., Cope,W.T., McArthur,C.L., Westfall, D.N., Fried,M.:
α-Ketoisocaproic acid inhibition of pyruvate and α-ketoglutarate oxidative decarboxylation in rat liver slices.
Biochem.Med.4, 69-76, 1970

19. Brodehl,J., Gellissen,K.:
Endogenous Renal Transport of Free Amino Acids in Infancy and Childhood.
Pediatrics 42, 395-404, 1968

20. Bürgi,W., Richterich,R., Colombo,J.P.:
L-Lysine dehydrogenase deficiency in a patient with congenital lysine intolerance.
Nature 211, 854-855, 1966

21. Calvert,A.F., Rodwell,V.W.:
Metabolism of pipecolic acid in a Pseudomonas species. III.
L-α-Aminoadipate δ-semialdehyde: nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase.
J.Biol.Chem.241, 409-414, 1966

22. Carson,N.A.J., Scally,B.G., Neill,D.W., Carre,I.J.:
Saccharopinuria: A new inborn error of lysine metabolism.
Nature 218, 679, 1968

23. Carson,N.A.J.:
Saccharopinuria: a new inborn error of lysine metabolism.
In: Enzymopenic anaemias, lysosomes and other papers.
Proc. 6th Symposium of S.S.I.E.M., p. 163. Eds. J.D. Allan, K.S. Holt, J.T. Ireland, R.J. Pollitt. Livingstone, Edinburgh, 1969

24. Carsten,M.E.:
A procedure for the ion exchange chromatography of the amino acids of urine.
J.Am.Chem.Soc.74, 5954-5959, 1952

25. Carver,M.J., Paska,R.:
Ion-exchange chromatography of urinary amino acids. I. Normal children.
Clin.Chim.Acta 6, 721-724, 1961

26. Casey,R.:
Patient with alpha-aminoadipic aciduria.
Vortrag auf 16. Meeting S.S.I.E.M. Bristol, 1978

27. Cathelineau,L., Saudubray,J.M., Charpentier,C., Polonovski,C.:
Letters to the editor.
Pediatr.Res.8, 857, 1974

28. Chalmers,R.A., Lawson,A.M., Watts,R.W.E.:
Studies on the urinary acidic metabolites excreted by patients with ß-methylcrotonylglycinuria, propionic acidaemia and methylmalonic acidaemia, using gas-liquid chromatography and mass spectrometry.
Clin.Chim.Acta 52, 43-51, 1974

29. Chalmers,R.A., Lawson,A.M., Whitelaw,A., Purkiss,P.:
Organic acids in Reye's like syndrome: similarities with Jamaican vomiting sickness.
Lancet I, 1156-1157, 1977

30. Chang,Y.F., Adams,E.:
Induction of separate catabolic pathways for L- and D-lysine in Pseudomonas putida.
Biochem.Biophys.Res.Commun.45, 570-577, 1971

31. Chang,Y.F.:
Pipecolic Acid Pathway: The Major Lysine Metabolic Route in the Rat Brain.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 69, 174-180, 1976

32. Chang,Y.F., Adams.E.:
Glutarate semialdehyde dehydrogenase of Pseudomonas. Purification , properties and relation to lysine catabolism.
J.Biol.Chem.252, 7979-7986, 1977 a

33. Chang,Y.F., Adams,E.:
Factors influencing growth on lysine by Pseudomonas. Regulation of terminal enzymes in the δ-aminovalerate pathway and growth stimulation by α-ketoglutarate.
J.Biol.Chem.252, 7987-7991, 1977 b

34. Chang,Y.F.:
Lysine metabolism in the rat brain: the pipecolic acid - forming pathyway.
J.Neurochem.30, 347-354, 1978 a

35. Chang,Y.F.:
Lysine metabolism in the rat brain: blood-brain barrier transport, formation of pipecolic acid and human hyperpipecolatemia.
J.Neurochem.30, 355-360, 1978 b

36. Colombo,J.P., Richterich,R., Donath,A., Spahr,A., Rossi,E.:
Congenital lysine intolerance with periodic ammonia intoxication.
Lancet I, 1014-1015, 1964

37. Colombo,J.P., Bürgi,W., Richterich,R., Rossi,E.:
Congenital lysine intolerance with periodic ammonia intoxication: a defect in L-lysine degradation.
Metabolism 16, 910-925, 1967

38. Colombo,J.P., Vassella,F., Humbel,R., Bürgi,W.:
Lysine Intolerance with Periodic Ammonia Intoxication.
Am.J.Dis.Child.113, 138-141, 1967

39. Colombo,J.P.: Congenital disorders of the urea cycle and ammonia detoxication.
In: Monographs in Pediatrics, Vol. 1. Karger, Basel, 1971

40. Corredor,C., Brendel,K., Bressler,R.:
Studies on the mechanism of the hypoglycemic action of 4-pentenoic acid.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 58, 2299-2306, 1967

41. Cotte,J., Collombel,C., Cuivré,M., Padis,L.:
Séparation chromatographique sur couche mince des acides alphacétoniques urinaires.
Rev.Franç.Études Clin.et Biol.12, 496-499, 1967

42. Dancis,J., Hutzler,J., Cox,R.P., Woody,N.C.:
Familial Hyperlysinemia with Lysine-Ketoglutarate Reductase Insufficiency.
J.Clin.Invest.48, 1447-1452, 1969

43. Dancis,J.:
Abnormalities in the degradation of lysine.
In: W.L. Nyhan (Ed.): Heritable disorders of amino acid metabolism.
J. Wiley, New York, 1974, p.387

44. Dancis,J., Hutzler,J., Woody,N.C., Cox,R.P.:
Mutiple Enzyme Defects in Familial Hyperlysinemia.
Pediatr.Res.10, 686-691, 1976

45. Danks,D.M., Tippett,P., Adams,C., Campbell,C.:
Cerebro-Hepato-Renal Syndrome of Zellweger. Report of 8 Cases with Comments Upon Incidence, Liver Lesion, And a Fault in Pipecolic Acid Metabolism.
J.Pediatr.86, 382-387, 1975

46. Darling,S., Larsen,P.O.:
Saccharopine, a New Amino Acid in Baker's and Brewer's Yeast.
Acta Chem.Scand.15, 743-749, 1961

47. Dickinson,J.C., Hamilton,P.B.:
The Free Amino Acids of Human Spinal Fluid Determined by Ion Exchange Chromatography.
J.Neurochem.13, 1179-1187, 1966

48. Duran,M.:
A contribution to the study of organic aciduria.
Doktorarbeit, Utrecht 1974

49. Entman,M., Bressler,R.:
The Mechanism of Action of Hypoglycin on Long Chain-Fatty Acid Oxidation.
Mol.Pharmacol.3, 333-340, 1967

50. Fellows,F.C.:
Biosynthesis and degradation of saccharopine, an intermediate of lysine metabolism.
Biochem.J.136, 321-327, 1973

51. Fellows,F.C.I., Lewis,M.H.R.:
Lysine Metabolism in Mammals.
Biochem.J.136, 329-334, 1973

52. Fellows,F.C.I., Carson,N.A.J.:
Enzyme studies in a patient with saccharopinuria: a defect of lysine metabolism.
Pediatr.Res.8, 42-49, 1974

53. Fischer,M.H., Gerritsen,T., Opitz,J.M.:
α-Aminoadipic aciduria, a non-deleterious inborn metabolic defect.
Humangenetik 24, 265-270, 1974

54. Fjellstedt, T.A., Robinson,J.C.:
Purification and properties of L-lysine-α-ketoglutarate reductase from human placenta.
Arch.Biochem.Biophys.168, 536-548, 1975

55. Fjellstedt,T.A., Robinson,J.C.:
Properties of Partially Purified Saccharopine Dehydrogenase from Human Placenta.
Arch.Biochem.Biophys.171, 191-196, 1975

56. Foster,G.L., Rittenberg,D., Schoenheimer,R.:
Deuterium as an indication in the study of intermediary metabolism. XIV. Biological formation of deuteroamino acids.
J.Biol.Chem.125, 13-22, 1938

57. Freeman,J.M., Nicholson,J.F., Schimke,R.T., Rowland,L.P., Carter,S.:
Congenital Hyperammonemia.
Arch.Neurol.23, 430-437, 1970

58. Friede,J.D., Henderson,L.M.:
Metabolism of 5-Hydroxylysine in Pseudomonas fluorescens.
J.Bacteriol.127, 1239-1247, 1976

59. Fujioka,M., Nakatani,Y.:
Saccharopine Dehydrogenase. Interaction with Substrate Analogues.
Eur.J.Biochem.25, 301-307, 1972

60. Gale,E.F.:
The bacterial amino acid decarboxylases.
Adv.Enzymol.6, 1-32, 1946

61. Gatfield,P.D., Taller,E., Hinton,G.G., Wallace,A., Abdelnour, G.M., Haust,M.D.:
Hyperpipecolatemia: A New Metabolic Disorder Associated with Neuropathy and Hepatomegaly.
Can.Med.Assoc.J.99, 1215-1233, 1968

62. Gatfield,P.D., Taller,E.: Accumulation of lysine dipeptides in the brain in hyperpipecolatemia.
Brain Research 29, 170-174, 1971

63. Ghadimi,H., Binnington,V.I., Pecora,P.:
Hyperlysinemia associated with retardation.
N.Engl.J.Med.273, 723-729, 1965

64. Ghadimi,H., Kottmeier,P., Achs,R., Prabhu,R., Jaffe,B.:
Hereditary hyperlysinemia and lysine-induced crises.
J.Pediatr.67, 945-946, 1965 b

65. Ghadimi,H., Zischka,R., Binnington,V.I.:
Further studies on hyperlysinemia associated with retardation.
Am.J.Dis.Child.113, 146-151, 1967

66. Ghadimi,H., Chou,W.S., Kesner,L.:
Biosynthesis of Saccharopine and Pipecolic Acid from L-and D,L-^{14}C-Lysine by Human and Dog Liver in Vitro.
Biochem.Med.5, 56-66, 1971

67. Gholson,R.K., Rao,D.R., Henderson,L.M., Hill,R.J., Koeppe,R.E.:
The metabolism of D,L-tryptophan-7α-^{14}C by the rat.
J.Biol.Chem.230, 179-184, 1958

68. Gholson,R.K., Henderson,L.M., Mourkides,G.A., Hill,R.J., Koeppe, R.E.:
The metabolism of D,L-tryptophan-α-C^{14} by the rat.
J.Biol.Chem.234, 96-98, 1959

69. Gholson,R.K., Sanders,D.C., Henderson,L.M.:
Glutaric acid: A product of tryptophan metabolism.
Biochem.Biophys.Res.Commun.1, 98-100, 1959

70. Gholson,R.K., Hankes,L.V., Henderson,L.M.:
3-Hydroxyanthranilic acid as an intermediate in the oxidation of the indole nucleus of tryptophan.
J.Biol.Chem.235, 132-135, 1960

71. Gholson,R.K., Nishizuka,Y., Ichiyama.,A., Kawai,H., Nakamura,S., Hayaishi,O.:
New intermediate in the catabolism of tryptophan in mammalian liver.
J.Biol.Chem.237, PC 2043 - PC 2045, 1962

72. Goodman,S.I., Browder,J.A.:
Hydroxylysinuria in Association with Trisomy 21.
Lancet II, 1141-1142, 1970

73. Goodman,S.I., Browder,J.A., Hiles,R.A., Miles,B.S.:
Hydroxylysinemia: a Disorder due to a Defect in the Metabolism of Free Hydroxylysine.
Biochem.Med.6, 344-354, 1972

74. Goodman,S.I., Moe,P., Markey,S.P.:
Glutaric Acidemia: A new disorder of amino acid metabolism.
Pediatr.Res.8, 389/115, 1974

75. Goodman,S.I., Markey,S.P., Moe,P.G., Miles,B.S., Teng,C.C.:
Glutaric Aciduria: A "New" Disorder of Amino Acid Metabolism.
Biochem.Med.12, 12-21, 1975

76. Goodman,S.I., Kohlhoff,J.G.:
Glutaric Aciduria: Inherited Deficiency of Glutaryl-CoA Dehydrogenase Activity.
Biochem.Med.13, 138-140, 1975

77. Goodman,S.I., Norenberg,M.D., Shikes,R.H., Breslich,D.J., Moe,P.G.:
Glutaric aciduria: biochemical and morphologic considerations.
J.Pediatr.90, 746-750, 1977

78. Green,D.E., Mii,S., Mahler,H.B., Bock,R.M.:
Studies on the fatty acid oxidizing system of animal tissues. III. Butyryl coenzyme A dehydrogenase.
J.Biol.Chem.206, 1-12, 1954

79. Gregersen,N., Lauritzen,R., Rasmussen,K.:
Suberylglycine excretion in the urine from a patient with dicarboxylic aciduria.
Clin.Chim.Acta 70, 417-425, 1976

80. Gregersen,N., Brandt,N.J., Christensen,E., Grøn,I., Rasmussen,K., Brandt,S.:
Glutaric aciduria: clinical and laboratory findings in two brothers.
J.Pediatr.90, 740-745, 1977 a

81. Gregersen,N., Kølvraa,S., Rasmussen,K., Grøn,I.:
Demonstration of N-dicarboxyl-mono-glycines in dicarboxylic acidurias by mass fragmentography.
Clin.Chim.Acta 78, 173-182, 1977 b

82. Grobbelaar,N., Steward,F.C.:
Pipecolic acid in phaseolus vulgaris: evidence on its derivation from lysine.
J.Am.Chem.Soc.75, 4341-4343, 1953

83. Grove,J., Henderson,L.M.:
The metabolism of D- and L-lysine in the intact rat, perfused liver and liver mitochondria.
Biochim.Biophys.Acta 165, 113-120, 1968

84. Grove,J.A., Gilbertson,T.J., Hammerstedt,R.H., Henderson,L.M.:
The metabolism of D- and L-lysine specifically labeled with ^{15}N.
Biochim.Biophys.Acta 184, 329-337, 1969

85. Grove,J.A., Roghair,H.G.:
The metabolism of D- and L-lysine in the chicken.
Arch.Biochem.Biophys.144, 230-236, 1971

86. Halperin,M.L., Schiller,C.M., Fritz,I.B :
The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria.
J.Clin.Invest.50, 2276-2282, 1971

87. Hammerstedt,R.H., Swan,P.B., Henderson,L.M.:
Degradation of 5-Hydroxylysine in the rat and in the perfused liver.
Arch.Biochem.Biophys.128, 243-251, 1968

88. Harrington,W., Liu,A.-S., Lonsdale,D., Igou,D.:
Urinary organic acid profiles in Reye's syndrome patients.
Clin.Chim.Acta 74, 247-254, 1977

89. Hartline,R.A., Rodwell,V.W.:
Metabolism of Pipecolic Acid in a Pseudomonas Species. VI. Precursors of Glutamate.
Arch.Biochem.Biophys.142, 32-39, 1971

90. Hassall,C.H., Reyle,K., Feng,P.:
Hypoglycin A,B: Biologically Active Polypeptides from Blighia sapida.
Nature 173, 356-357, 1954

91. Hassall,C.H., Reyle,L.:
Hypoglycin A and B, two Biologically Active Polypeptides from Blighia sapida.
Biochem.J.60, 334-339, 1955

92. Hegre,C.S., Halenz,D.R., Lane,M.D.:
The enzymatic carboxylation of butyryl coenzyme A.
J.Am.Chem.Soc. 81, 6526-6527, 1959

93. Henderson,L.M., Hirsch,H.M.:
Quinolinic acid metabolism.
J.Biol.Chem.181, 667-675, 1949

94. Higashino,K., Tsukada,K., Lieberman,I.:
Saccharopine, a product of lysine breakdown by mammalian liver.
Biochem.Biophys.Res.Commun.20, 285-290, 1965

95. Higashino,K., Fujioka,M., Aoki,T., Yamamura,Y.:
Metabolism of lysine in rat liver.
Biochem.Biophys.Res.Commun.29, 95-100, 1967

96. Higashino,K., Fujioka,M., Yamamura,Y.:
The conversion of L-Lysine to Saccharopine and α-Aminoadipate in Mouse.
Arch.Biochem.Biophys.142, 606-614, 1971

97. Hiles,R.A., Triebwasser,K.C., Henderson,L.M.:
The Degradation of Hydroxy-L-Lysine in Liver via its Phosphate Ester.
Biochem.Biophys.Res.Commun.41, 662-668, 1970

98. Hiles,R.A., Henderson,L.M.:
The partial purification and properties of hydroxylysine kinase from rat liver.
J.Biol.Chem.247, 646-651, 1972

99. Hiles,R.A., Willett,C.J., Henderson,L.M.:
Hydroxylysine metabolism in rats, mice and chickens.
J.Nutrition 102, 195-204, 1972

100. Hirashima,M., Hayakawa,T., Koike,M.:
Mammalian α-ketoacid dehydrogenase complexes II.
J.Biol.Chem.242, 902-907, 1967

101. Hobbs,D.C., Koeppe,R.E.:
The metabolism of glutaric acid-3-^{14}C by the intact rat.
J.Biol.Chem.230, 655-660, 1958

102. Hoefnagel,D., Pomeroy,J.:
Hydroxylysinuria.
Lancet I, 1342-1343, 1970

103. Hussein,L., Müller,R.:
Rat hepatic lysine-2-oxoglutarate reductase activity. Induction by lysine, glucagon, and cycloheximide administration.
Nutr.Metab.22, 127-140, 1978

104. Hutzler,J., Dancis,J.:
Conversion of lysine to saccharopine by human tissues.
Biochim.Biophys.Acta 158, 62-69, 1968

105. Hutzler,J., Dancis,J.:
Saccharopine cleavage by a dehydrogenase of human liver.
Biochim.Biophys.Acta 206, 205-214, 1970

106. Hutzler,J., Dancis,J.:
Lysine-ketoglutarate reductase in human tissues.
Biochim.Biophys.Acta 377, 42-51, 1975

107. Jagenburg,O.R.:
The urinary excretion of free amino acids and other amino acid compounds by the human.
Scand.J.Clin.Lab.Invest.11, Suppl.43, 1959

108. Jelliffe,D.B., Stuart,K.L.:
Acute toxic hypoglycaemia in the vomiting sickness of jamaica.
Br.Med.J.1, 75-77, 1954

109. Johnson,W.A., Connelly,J.L.:
Studies on the mutual influences of substrates on bovine α-keto acid metabolism.
Biochemistry 11, 2416-2421, 1972

110. Jones,E.E., Broquist,H.P.:
Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. III. Aminoadipic semialdehydeglutamate reductase.
J.Biol.Chem.241, 3430-3434, 1966

111. Kakimoto,Y., Akazawa,S.:
Isolation and Identification of N^G,N^G and N^G,N'^G-Dimethylarginine, N^ε-Mono-, Di-, and Trimethyllysine, and Glucosylgalactosyl- and Galactosyl-δ-hydroxylysine from Human Urine.
J.Biol.Chem.245, 5751-5758, 1970

112. Kanzaki,T., Hayakawa,T., Hamada,M., Fukuyoshi,Y., Koike,M.:
Mammalian α-ketoacid dehydrogenase complexes. IV.
J.Biol.Chem.244, 1183-1187, 1969

113. Kasé,Y., Kataoka,M., Miyata,T.:
In vitro production of piperidine from pipecolic acid in the presence of brain tissue.
Life Sciences 6, 2427-2431, 1967

114. Kean,E.A.:
Selective inhibition of acyl-CoA dehydrogenases by a metabolite of hypoglycin.
Biochim.Biophys.Acta 422, 8-14, 1976

115. Kraffczyk,F., Helger,R., Lang,H., Bremer,H.J.:
Thin layer chromatographic screening test for amino acid anomalies in urine without desalting using internal standards.
Clin.Chim.Acta 35, 345-351, 1971

116. Kuo,M.H., Saunders,P.P., Broquist,H.P.:
Lysine biosynthesis in yeasts: a new metabolite of α-aminoadipic acid.
J.Biol.Chem.239, 508-515, 1964

117. Kyllerman,M., Steen,G.:
Intermittently progressive dyskinetic syndrome in glutaric aciduria.
Neuropaediatrie 8, 397-404, 1977

118. Landaas,S.:
Increased urinary excretion of 3-hydroxy-isovaleric acid in patients with ketoacidosis.
Clin.Chim.Acta 54, 39-46, 1974

119. Landaas,S.:
Accumulation of 3-hydroxyisobutyric acid, 2-methyl-3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in ketoacidosis.
Clin.Chim.Acta 64, 143-154, 1975

120. Landaas,S., Jacobs,C.:
The occurrence of 2-hydroxyisovaleric acid in patients with lactic acidosis and ketoacidosis.
Clin.Chim.Acta 78, 489-493, 1977

121. Leistner,E., Gupta,R.N., Spenser,I.D.:
A general method for the determination of precursor configuration in biosynthetic precursor-product relationships. Derivation of pipecolic acid from D-lysine and of piperidine alkaloids from L-lysine.
J.Am.Chem.Soc.95, 4040-4047, 1973

122. Leistner,E., Spenser,I.D.:
Biosynthesis of the piperidine nucleus. Incorporation of chirally labeled [1-^{3}H] cadaverine.
J.Am.Chem.Soc.95, 4715-4725, 1973

123. Levin,B., Oberholzer,V.G., Palmer,T.:
Citrullinemia and an alternative urea cycle.
Pediatr.Res.7, 728, 1973

124. Levin,B., Oberholzer,V.G., Palmer,T.:
Citrullinemia and an alternative urea cycle.
Pediatr.Res.8, 857-858, 1974

125. Levy,H.L., Madigan,P.M., Shih,V.E.:
Massachusetts metabolic disorders screening program. I.
Technics and results of urine screening.
Pediatrics 49, 825-836, 1972

126. Lindahl,G., Lindstedt,G., Lindstedt,S.:
Metabolism of 2-Amino-5-Hydroxyadipic Acid in the Rat.
Arch.Biochem.Biophys.119, 347-352, 1967

127. Lindstedt,S., Lindstedt,G.:
On the formation of 5-hydroxy-pipecolic acid from δ-hydroxy-D,L-lysine.
Arch.Biochem.Biophys.85, 565-567, 1959

128. Lindstedt,S., Lindstedt,G., Mitoma,C.:
Studies on the metabolism of lysine and 5-hydroxylysine.
Arch.Biochem.Biophys.119, 336-346, 1967

129. Lindstedt,S., Norberg,K., Steen,G., Wahl,E.:
Structure of some aliphatic dicarboxylic acids found in the urine of an infant with congenital lactic acidosis.
Clin.Chem.22, 1330-1338, 1976

130. Lormans,S., Lowenthal,A.:
α-Aminoadipic aciduria in an oligophrenic child.
Clin.Chim.Acta 57, 97-101, 1974

131. Mamer,O.A., Crawhall,J.C., Tjoa,S.S.:
The identification of urinary acids by coupled gas chromatography mass spectrometry.
Clin.Chim.Acta 32, 171-184, 1971

132. Mamer,O.A., Tjoa,S.S., Scriver,C.R., Klassen,G.A.:
Demonstration of a new mammalian isoleucine catabolic pathway yielding an R series of metabolites.
Biochem.J.160, 417-426, 1976

133. Mamunes,P., de Vries,G.H., Miller,C.D., David,R.B.:
Fatty Acids in Reye's Syndrome.
Pediatr.Res.8, 436, 1974

134. McMenamy,R.H., Lund,C.C., Oncley,J.L.:
Unbound amino acid concentrations in human blood plasmas.
J.Clin.Invest.36, 1672-1679, 1957

135. Meghal,S.K., Cheung,H.S., O'Neal,R.M., Koeppe,R.E.:
Metabolism of D,L-Lysine-2 and -6-^{14}C in rats and dogs.
J.Biol.Chem.241, 2622-2625, 1966

136. Mehler,A.H.:
Formation of picolinic and quinolinic acids following enzymatic oxidation of 3-hydroxyanthranilic acid.
J.Biol.Chem.218, 241-254, 1956

137. Meister,A., Radhakrishnan,A.N., Buckley,S.D.:
Enzymatic synthesis of L-pipecolic acid and L-proline.
J.Biol.Chem.229, 789-800, 1957

138. Milner,R.D.G., Wirdnam,P.K.:
Hypoglycin Stimulates Insulin Secretion.
Diabetologia 13 (1977) 637-638

139. Misono,H., Soda,K.:
L-lysine-α-ketoglutarate ε-aminotransferase. Properties of the bound pyridoxal 5'-phosphate.
J.Biochem.(Tokio) 82, 535-543, 1977

140. Moore,S., Spackman,D.H., Stein,W.H.:
Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system.
Analyt.Chem.30, 1185-1190, 1958

141. Müller,W.-U., Leistner,E.:
Conversion of D-lysine to L-Lysine via L-Pipecolic Acid in Neurospora crassa.
Z.Naturforsch.30 C, 253-262, 1975

142. Nakatani,Y., Fujioka,M., Higashino,K.:
α-Aminoadipate aminotransferase of rat liver mitochondria.
Biochim.Biophys.Acta 198, 219-228, 1970

143. Neuberger,A., Sanger,F.:
The metabolism of lysine.
Biochem.J.38, 119-125, 1944

144. Newman,C.G.H., Callaghan,P., Wilson,B.D.R., Young,L.:
Neonatal death associated with isovalericacidaemia.
Lancet II, 439-441, 1967

145. Nishizuka,Y., Ichiyama,A., Gholson,R.K., Hayaishi,O.:
Studies on the metabolism of the benzene ring of tryptophan in mammalian tissue. I. Enzymic formation of glutaric acid from 3-OH anthranilic acid.
J.Biol.Chem.240, 733-739, 1965

146. Nishizuka,Y., Ichiyama,A., Hayaishi,O.:
Metabolism of the benzene ring of tryptophan (mammals).
Methods in Enzymology 17 A, p. 463-491, 1970

147. Noda,C., Ichihara,A.:
Purification and properties of L-lysine-α-ketoglutarate reductase from rat liver mitochondria.
Biochim.Biophys.Acta 525, 307-313, 1978

148. Nordmann,R., Gauchery,O., du Ruisseau,J.-P., Thomas,Y., Nordmann,J.:
Chromatographie sur papier des acides organiques non volatils des liquides biologiques. II. Le chromatogramme qualitatif de l'urine humaine normale.
Bull.Soc.Chim.Biol.36, 1641-1654, 1954

149. Numa,S., Ishimura,Y., Nakazawa,T., Okazaki,T., Hayaishi,O.:
Enzymic Studies on the Metabolism of Glutarate in Pseudomonas.
J.Biol.Chem.239, 3915-3926, 1964

150. Ogawa,H., Fujioka,M.:
Purification and characterization of saccharopine dehydrogenase from baker's yeast.
J.Biol.Chem.253, 3666-3670, 1978

151. Onodera,R., Kandatsu,M.: Catabolism of Lysine by Mixed Rumen Bacteria.
Agricult.Biol.Chem.39, 1239-1246, 1975

152. Osmundsen,H., Sherratt,H.S.A.:
A novel mechanism for inhibition of ß-oxidation by methylene-cyclopropylacetyl-CoA, a metabolite of hypoglycin.
FEBS Letters 55, 38-41, 1975

153. Osmundsen,H., Billington,D., Taylor,J.R., Sherratt,H.S.A.:
The effects of hypoglycin on glucose metabolism in the rat. A kinetic study in vivo with [U-^{14}C,2-^{3}H]glucose.
Biochem.J.170, 337-342, 1978

154. Oyanagi,K., Sogawa,H., Sato,S., Orii,T., Nakao,T., Fujita,S.:
Clinical and biochemical studies on periodic hyperammonemia with hyperlysinemia and homocitrullinemia.
Tohoku J.Exp.Med.120, 105-112, 1976

155. Paik,W.K., Benoiton,L.:
Purification and properties of hog kidney ε-lysine acylase.
Can.J.Biochem.Physiol.41, 1643-1654, 1963

156. Paik,W.K., Kim,S.:
Enzymic synthesis of ε-N-acetyl-L-lysine.
Arch.Biochem.Biophys.108, 221-229, 1964

157. Paik,W.K., Pearson,E., Nochumson,S., Kim,S.:
Replacement of L-ornithine with L-lysine for urea cycle enzymes.
Int.J.Biochem.8, 317-321, 1977

158. Parker,C.E., Shaw,K.N.F., Jacobs,E.E., Gutenstein,M.:
Hydroxylysinuria.
Lancet 1, 1119-1120, 1970

159. Perfetti,R., Campbell,R.J., Titus,J., Hartline,R.A.:
Catabolism of Pipecolate to Glutamate in Pseudomonas putida.
J.Biol.Chem.247, 4089-4095, 1972

160. Perry,T.L., Hansen,S., Kloster,M.:
Huntington's Chorea: Deficiency of γ-Aminobutyric Acid in Brain.
N.Engl.J.Med.288, 337-342, 1973

161. Pettersen,J.E., Jellum,E., Eldjarn,L.:
The occurrence of adipic and suberic acid in urine from ketotic patients.
Clin.Chim.Acta 38, 17-24, 1972

162. Pettersen,J.E.:
Formation of n-hexanedioic acid from hexadecanoic acid by an initial omega oxidation in ketotic rats.
Clin.Chim.Acta 41, 231-237, 1972

163. Piez,K.A., Irreverre,F.I., Wolff,H.L.:
The separation and determination of cyclic amino acids.
J.Biol.Chem.223, 687-697, 1956

164. Pohlandt,F.:
Der Aminosäurenbedarf des Feten und des Neugeborenen unter parenteraler Ernährung.
Habilitationsschrift, Ulm, 1978

165. Polan,C.E., Smith,W.G., Ng,C.Y., Hammerstedt,R.H., Henderson,L.M.:
Metabolism of hydroxylysine by rats.
J.Nutr.91, 143-150, 1967

166. Przyrembel,H., Bachmann,D., Lombeck,I., Becker,K., Wendel,U., Wadman,S.K., Bremer,H.J.:
Alpha-ketoadipic aciduria, a new inborn error of lysine metabolism; biochemical studies.
Clin.Chim.Acta 58, 257-269, 1975

167. Przyrembel,H., Wendel,U., Becker,K., Bremer,H.J., Bruinvis,L., Ketting,D., Wadman,S.K.:
Glutaric aciduria type II: Report on a previously undescribed metabolic disorder.
Clin.Chim.Acta 66, 227-239, 1976

168. Rose,W.C.:
The nutritive significance of the amino acids.
Physiol.Rev.18, 109-136, 1938

169. Rose,W.C., Borman,A., Coon,M.J., Lambert,G.F.:
The amino acid requirements of man. X. The lysine requirement.
J.Biol.Chem.214, 579-587, 1955

170. Rothstein,M., Miller,L.L.:
The conversion of L-lysine-6-^{14}C to pipecolic acid in the rat.
J.Am.Chem.Soc.75, 4371-4372, 1953

171. Rothstein,M., Miller,L.L.:
The metabolism of L-lysine-6-C^{14}.
J.Biol.Chem.206, 243-253, 1954

172. Rothstein,M., Miller,L.L.:
The conversion of lysine to pipecolic acid in the rat.
J.Biol.Chem.211, 851-858, 1954

173. Rothstein,M., Miller,L.L.:
The metabolism of glutaric acid-1,5-^{14}C. II. Conversion to α-ketoglutaric acid in the intact rat.
J.Biol.Chem.211, 859-865, 1954

174. Rothstein,M., Miller,L.L.:
Loss of the α-amino group in lysine metabolism to form pipecolic acid.
J.Am.Chem.Soc.76, 1459, 1954

175. Rothstein,M., Greenberg,D.M.:
The metabolism of D,L-pipecolic acid-2-^{14}C.
J.Biol.Chem.235, 714-718, 1960

176. Ruderman,N., Shafrir,E., Bressler,R.:
Relation of fatty acid oxidation to gluconeogenesis: Effect of pentenoic acid.
Life Sci.7, 1083-1089, 1968

177. Ryan,W.L., Wells,I.C.:
Homocitrulline and homoarginine synthesis from lysine.
Science 144, 1122-1123, 1964

178. Saunders,P.P., Broquist,H.P.:
Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. IV. Saccharopine dehydrogenase.
J.Biol.Chem.241, 3435-3440, 1966

179. Schmidt-Glenewinkel,T., Nomura,Y., Giacobini,E.:
The Conversion of Lysine into Piperidine, Cadaverine, and Pipecolic Acid in the Brain and Other Organs of the Mouse.
Neurochem.Res.2, 619-637, 1977

180. Schweet,R.S., Holden,J.T., Lowy,P.H.:
The metabolism of lysine in neurospora.
J.Biol.Chem.211, 517-529, 1954

181. Schweet,R.S.:
The quantitative Determination of Proline and Pipecolic Acid with Ninhydrin.
J.Biol.Chem.208, 603-613, 1954

182. Scott-Emuakpor,A., Higgins,J.V., Kohrman,A.F.:
Citrullinemia: A New Case, with Implications Concerning Adaptation to Defective Urea Synthesis.
Pediatr.Res.6, 626-633, 1972

183. Scott-Emuakpor,A.B.:
On a late developing urea cycle.
Pediatr.Res.8, 858-859, 1974

184. Scriver,C.R., Davies,E.:
Endogenous Renal Clearance Rates of Free Amino Acids in Pre-Pubertal Children.
Pediatr.36, 592-598, 1965

185. Seakins,J.W.T.:
Combined alpha-aminoadipicaciduria and glutaricaciduria in siblings.
Vortrag auf 16. Meeting S.S.I.E.M., Bristol 1978

186. Sherratt,H.S.A.:
Hypoglycin and related hypoglycaemic compounds.
Br.Med.Bull.25, 250-255, 1969

187. Sherratt,H.S.A., Osmundsen,H.:
On the mechanisms of some pharmacological actions of the hypoglycaemic toxins hypoglycin and pent-4-enoic acid: a way out of the present confusion.
Biochem.Pharmacol.25, 743-750, 1976

188. Sidbury,J.B., Smith,E.K., Harlan,W.:
An inborn error of short-chain fatty acid metabolism.
J.Pediatr.70, 8-15, 1967

189. Silberstein,O.O., Adjarian,R.M., Thompson,J.F.:
Determination of pipecolic acid in biological materials.
Anal.Chem.28, 855-857, 1956

190. Simell,O., Visakorpi,J.K., Donner,M.:
Saccharopinuria.
Arch.Dis.Child.47, 52-55, 1972

191. Simell,O., Johansson,T., Aula,P.:
Enzyme defect in saccharopinuria.
J.Pediatr.82, 54-57, 1973

192. Sinex,F.M., van Slyke,D.D., Christman,D.R.:
The source and state of the hydroxylysine of collagen.
J.Biol.Chem.234, 918-921, 1959

193. Sinha,A.K., Bhattacharjee,J.K.:
Lysine biosynthesis in saccharomyces. Conversion of α-aminoadipate into α-aminoadipic δ-semialdehyde.
Biochem.J.125, 743-749, 1971

194. Smith,T.H., Holland,M.G., Woody,N.C.:
Ocular manifestations of familial hyperlysinemia.
Trans.Am.Acad.Ophthalmol.Otolaryngol.75, 355-360, 1971

195. Snyderman,S.E., Norton,P.M., Fowler,D.I., Holt,L.E.:
The essential amino acid requirements of infants: lysine.
Am.J.Dis.Child.97, 175-185, 1959

196. Sogawa,H., Oyanagi,K., Nakao,T.:
Periodic hyperammonemia, hyperlysinemia and homocitrullinuria associated with decreased argininosuccinate synthetase and arginase activity.
Pediatr.Res.11, 949-953, 1977

197. Sonada,Y.:
Urinary amino acids of hyperthyroid patients.
Proc.Japan Acad. 33, 162, 1957 (cit. in Jagenburg, 1959)

198. Spackman,D.H., Stein,W.H., Moore,S.:
Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids.
Analyt.Chem.30, 1190-1206, 1958

199. Suda,T., Robinson,J.C., Fjellstedt,T.A.:
Purification and Properties of α-Ketoadipate Reductase, a Newly Discovered Enzyme from Human Placenta.
Arch.Biochem.Biophys.176, 610-620, 1976

200. Suda,T., Robinson,J.C., Fjellstedt,T.A.:
Subcellular localization and tissue di tribution of α-ketoadipate reduction and oxidation in the rat.
Biochem.Biophys.Res.Commun.77, 586-591, 1977

201. Suda,T., Robinson,J.C., Fjellstedt,T.A.:
Developmental changes in enzymatic capacity for reduction and oxidation of alpha-ketoadipate in rat liver, heart, kidney, and brain.
Pediatr.Res.12, 297-300, 1978

202. Stadtman,T.C.:
Anaerobic degradation of lysine.
J.Biol.Chem.238, 2766-2772, 1963

203. Stalder,K.:
Über das Vorkommen von Äthylmalonsäure im Harn.
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem.314, 205-210, 1959

204. Stein,W.H.:
A chromatographic investigation of the amino acid constituents of normal urine.
J.Biol.Chem.201, 45-58, 1953

205. Stern,J.R., Friedman,D.L., Menon,G.K.K.:
Enzymic carboxylation of butyryl Coenzyme A.
Biochim.Biophys.Acta 36, 299-300, 1959

206. Stokke,O., Goodman,S.I., Thompson,J.A., Miles,B.S.:
Glutaric Aciduria: Presence of Glutaconic and ß-Hydroxyglutaric Acids in Urine.
Biochem.Med.12, 386-391, 1975

207. Stokke,O., Goodman,S.I., Moe,P.G.:
Inhibition of brain glutamate decarboxylase by glutarate, glutaconate, and ß-hydroxyglutarate: explanation of the symptoms in glutaric aciduria?
Clin.Chim.Acta 66, 411-415, 1976

208. Tanaka,K., Budd,M.A., Efron,M.L., Isselbacher,K.J.:
Isovaleric acidemia: A new genetic defect of leucine metabolism.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 56, 236-242, 1966

209. Tanaka,K., Isselbacher,K.J.:
The Isolation and Identification of N-Isovalerylglycine from Urine of Patients with Isovaleric Acidemia.
J.Biol.Chem.242, 2966-2972, 1967

210. Tanaka,K., Orr,J.C., Isselbacher,K.J.:
Identification of ß-hydroxyisovaleric acid in the urine of a patient with isovaleric acidemia.
Biochim.Biophys.Acta 152, 638-641, 1968

211. Tanaka,K.:
On the Mode of Action of Hypoglycin A.
III. Isolation and identification of cis-4-decene-1,10-dioic,cis, cis-4,7-decadiene-1,10-dioic,cis-4-octene-1,8-dioic,glutaric and adipic acids, N-(methylenecyclopropyl)acetylglycine, and N-isovalerylglycine from urine of hypoglycin A treated rats.
J.Biol.Chem.247, 7465-7478, 1972

212. Tanaka,K., Isselbacher,K.J., Shih,V.:
Isovaleric and α-Methylbutyric Acidemias Induced by Hypoglycin A: Mechanism of Jamaican Vomiting Sickness.
Science 175, 69-71, 1972

213. Tanaka,K.,
Branched pentanoic acidemia and medium chain dicarboxylic aciduria induced by hypoglycin A:
Inhibition of several short chain acyl-CoA dehydrogenases.
In: E.A.Kean (Ed.): Hypoglycin. Academic Press, New York, pp. 67-92, 1975

214. Tanaka,K., Kerley,R.:
Synergistic hypoglycemic effects of lysine and tryptophan with hypoglycin A. Interrelationship between the inhibition of glutaryl-CoA dehydrogenase and gluconeogenesis.
In: E.A.Kean (Ed.): Hypoglycin. Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 163-173, 1975

215. Tanaka,K., Mandell,R., Shih,V.E.:
Metabolism of [1-C^{14}] and [2-C^{14}]leucine in cultured skin fibroblasts from patients with isovaleric acidemia - Characterization of metabolic defects.
J.Clin.Invest.58, 164-172, 1976 a

216. Tanaka,K., Kean,E.A., Johnson,B.:
Jamaican Vomiting Sickness: Biochemical Investigation of two cases.
N.Engl.J.Med.295, 461-467, 1976 b

217. Tanaka,K., Ramsdell,H.S., Baretz,B.H., Keefe,M.B., Kean,A.E., Johnson,B.:
Identification of ethylmalonic acid in urine of two patients with the vomiting sickness of Jamaica.
Clin.Chim.Acta 69, 105-112, 1976 c

218. Tanaka,K., Mantagos,S., Genel,M., Seashore,M.R., Billings,B.A., Baretz,B.H.:
New defect in fatty acid metabolism with hypoglycemia and organic aciduria.
Lancet II, 986-987, 1977

219. Thomas,G.H., Haslam,R.H.A., Batshaw,M.L., Capute,A.J., Neidengard, L., Ransom,J.L.:
Hyperpipecolic acidemia associated with hepatomegaly, mental retardation, optic nerve dysplasia and progressive neurological disease.
Clin.Genet.8, 376-382, 1975

220. Thomas,K., Stalder,K.:
Über das Vorkommen von C_5-Dicarbonsäuren im Harn.
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 317, 269-275, 1959

221. Tobes,M.C., Mason,M.:
L-Kynurenine aminotransferase and L-α-aminoadipate aminotransferase. I. Evidence for identity.
Biochem.Biophys.Res.Commun.62, 390-397, 1975

222. Tobes,M.C., Mason,M.:
α-Aminoadipate aminotransferase and kynurenine aminotransferase. Purification, characterization, and further evidence for identity.
J.Biol.Chem.252, 4591-4599, 1977

223. Tobes,M.C., Mason,M.:
Kynurenine aminotransferase and alpha-aminoadipate aminotransferase. III. Evidence for identity with halogenated tyrosine aminotransferase.
Life Sciences 22, 792-802, 1978

224. Trauner,D., Sweetman,L., Holm,J., Kulovich,S., Nyhan,W.L.:
Biochemical correlates of illness and recovery in Reye's syndrome.
Ann.Neurol.2, 238-241, 1977

225. Trupin,J.S., Broquist,H.P.:
Saccharopine, an intermediate of the aminoadipic acid pathway of lysine biosynthesis. I. Studies in Neurospora crassa.
J.Biol.Chem.240, 2524-2530, 1965

226. Tsai,C.-H., Henderson,L.M.:
Degradation of o-phosphohydroxylysine by rat liver. Purification of the phospholyase.
J.Biol.Chem.249, 5784-5789, 1974

227. Tsai,C.-H., Henderson,L.M.:
Degradation of o-phosphohydroxylysine in rat liver. Purification and properties of 2-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase.
J.Biol.Chem.249, 5790-5792, 1974

228. van Gelderen,H.H., Teijema,H.L.:
Hyperlysinaemia. Harmless inborn error of metabolism?
Arch.Dis.Child.48, 892-895, 1973

229. von Holt,C., Leppla,W.:
Die Konstitution von Hypoglycin A.
Angew.Chem.70, 25, 1958

230. von Holt,C., Benedict,J.:
Biochemie des Hypoglycins A. II. Der Einfluß des Hypoglycins auf die Oxydation von Glucose und Fettsäuren.
Biochem.Zschr.331, 430-435, 1959

231. von Holt,L., von Holt,C.:
Biochemie des Hypoglycins A. I. Die Wirkung des Riboflavins auf den Hypoglycineffekt.
Biochem.Zschr.331, 422-429, 1959

232. von Holt,C.:
Methylenecyclopropaneacetic acid, a metabolite of hypoglycin.
Biochim.Biophys.Acta 125, 1-10, 1966

233. von Holt,C., von Holt,M., Böhm,H.:
Metabolic effects of hypoglycin and methylenecyclopropaneacetic acid.
Biochim.Biophys.Acta 125, 11-21, 1966

234. Wadman,S.K., van der Heiden,C., Ketting,D., van Sprang,F.J.:
Abnormal tyrosine and phenylalanine metabolism in patients with tyrosyluria and phenylketonuria; GLC chromatographic analysis of urinary metabolites.
Clin.Chim.Acta 34, 277-287, 1971

235. Wang,F.C.I., Lewis,M.H.R.:
Lysine biosynthesis in mammals.
Biochem.J.130, 74P-75P, 1972

236. Wang,S., Nesheim,M.C.:
Degradation of lysine in chicks.
J.Nutr.102, 583-596, 1972

237. Weissman,N., Schoenheimer,R.:
The relative stability of L(+)-lysine in rats studied with deuterium and heavy nitrogen.
J.Biol.Chem.140, 779-795, 1941

238. Wendel,U., Wöhler,W., Goedde,H.W., Langenbeck,U., Passarge,E., Rüdiger,H.W.:
Rapid diagnosis of maple syrup urine disease (branched chain keto-aciduria) by micro-enzyme assay in leukocytes and fibroblasts.
Clin.Chim.Acta 45, 433-440, 1973

239. Wendel,U., Rüdiger,H.W., Przyrembel,H., Bremer,H.J.:
Alpha-ketoadipic aciduria: degradation studies with fibroblasts.
Clin.Chim.Acta 58, 271-276, 1975

240. Whitehead,R.G.:
An unidentified compound in the serum of children with kwashiorkor (protein-calorie malnutrition).
Nature 204, 389, 1964

241. Wilson,C., Wilson,R.W., Higgins,J.V.:
α-Ketoadipic aciduria: a new metabolic error in lysine/tryptophan metabolism.
Excerpta Med.Int.Congr.Ser.No.297, p. 37, 1973

242. Wilson,R.W., Wilson,C.M., Gates,S.C., Higgins,J.V.:
α-Ketoadipic aciduria: a description of a new metabolic error in lysine-tryptophan degradation.
Pediatr.Res.9, 522-526, 1975

243. Wilson,R.W., Wilson,C.M., Higgins,J.V.: Metabolism of alpha-aminoadipic and alpha-ketoadipic acids: Studies using rat and beef livers, and human leukocytes.
Clin.Chim.Acta 69, 323-332, 1976

244. Woody,N.C.:
Hyperlysinemia.
Am.J.Dis.Child.108, 543-553, 1964

245. Woody,N.C., Hutzler,J., Dancis,J.:
Further studies of hyperlysinemia.
Am.J.Dis.Child.112, 577-580, 1966

246. Woody,N.C., Ong,E.B., Pupene,M.B.:
Paths of lysine degradation in patients with hyperlysinemia.
Pediatrics 40, 986-992, 1967

247. Woody,N.C., Pupene,M.B.:
Excretion of Pipecolic Acid by Infants and by Patients with Hyperlysinemia.
Pediatr.Res.4, 89-95, 1970

248. Woody,N.C., Pupene,M.B.:
Derivation of Pipecolic Acid from L-Lysine by Familial Hyperlysinemics.
Pediatr.Res.5, 511-513, 1971

249. Zacharius,R.M., Talley,E.A.:
Elution behaviour of naturally occurring ninhydrin-positive compounds during ion-exchange chromatography.
Anal.Chem.34, 1551-1556, 1962